

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/34, C07K 14/01, A61K 39/12, 48/00, C12Q 1/68, C07K 16/08, G01N 33/53		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/18214 (43) Date de publication internationale: 15 avril 1999 (15.04.99)									
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/02107 (22) Date de dépôt international: 1er octobre 1998 (01.10.98)		(72) Inventeurs: ALLAN, Gordon; 51 Cabinhill Gardens, Belfast BT5 7AQ (GB). MEEHAN, Brian; 26 St. John's Close, 2 Laganbank Road, Belfast BT1 3LX (GB). CLARK, Edward; 22 Murphy Crescent, Saskatoon, Saskatchewan S7J 214 (CA). ELLIS, John; 812, 13th Street East, Saskatoon, Saskatchewan S7N 0M3 (CA). HAINES, Deborah; 812, 13th Street East, Saskatoon, Saskatchewan S7N 0M3 (CA). HASSARD, Lori; 443 Perreault Lane, Saskatoon, Saskatchewan S7K 2A0 (CA). HARDING, John; 43 Jubilee Drive, Humboldt, Saskatchewan S0K 2A0 (CA). CHARREYRE, Catherine, Elisabeth; 42, rue Ferdinand Gauthier, F-69720 Saint-Laurent de Mure (FR). CHAPPUIS, Gilles, Emile; 3, rue Laurent Vibert, F-69006 Lyon (FR).										
(30) Données relatives à la priorité: <table><tr><td>97/12382</td><td>3 octobre 1997 (03.10.97)</td><td>FR</td></tr><tr><td>98/00873</td><td>22 janvier 1998 (22.01.98)</td><td>FR</td></tr><tr><td>98/03707</td><td>20 mars 1998 (20.03.98)</td><td>FR</td></tr></table>		97/12382	3 octobre 1997 (03.10.97)	FR	98/00873	22 janvier 1998 (22.01.98)	FR	98/03707	20 mars 1998 (20.03.98)	FR	(74) Mandataire: COLOMBET, Alain; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).	
97/12382	3 octobre 1997 (03.10.97)	FR										
98/00873	22 janvier 1998 (22.01.98)	FR										
98/03707	20 mars 1998 (20.03.98)	FR										
(71) Déposants: MERIAL [FR/FR]; 17, rue Bourgelat, F-69002 Lyon (FR). THE QUEEN'S UNIVERSITY OF BELFAST [GB/GB]; Stoney Road, Stormont, Belfast BT4 3SD (GB). UNIVERSITY OF SASKATCHEWAN [CA/CA]; 52 Campus Drive, Saskatoon, Saskatchewan S7W 5B4 (CA).		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).										
<p style="text-align: center;">Publiée</p> <p><i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont requises.</i></p>												
(54) Title: PORCINE CIRCOVIRUSES, VACCINES AND DIAGNOSTIC REAGENTS												
(54) Titre: CIRCOVIRUS PORCINS, VACCINS ET REACTIFS DE DIAGNOSTIC												
(57) Abstract												
<p>The invention concerns porcine circovirus strains isolated from pulmonary and ganglionary specimens derived from livestock suffering from postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). It concerns purified preparations of said strains, attenuated or inactivated standard vaccines, recombinant live vaccines, plasmid vaccines and subunit vaccines, as well as diagnostic reagents and methods. The invention also concerns DNA fragments useful for producing subunits in a expression vector in vitro or as sequences to be integrated in an expression vector in vivo of virus or plasmid type.</p>												
(57) Abrégé												
<p>L'invention concerne des souches de circovirus porcin isolées à partir de prélèvements pulmonaires ou ganglionnaires provenant d'élevage atteints par le syndrome de dépréhension généralisé de post-sevrage (en anglais PMWS). Elle concerne des préparations purifiées de ces souches, des vaccins classiques atténus ou inactivés, des vaccins vivants recombinants, des vaccins plasmidiques et des vaccins de sous-unités, ainsi que des réactifs et méthodes de diagnostic. Elle concerne aussi des fragments d'ADN pouvant être utilisés pour la production de sous-unités dans un vecteur d'expression in vitro ou comme séquences à intégrer dans un vecteur d'expression in vivo de type virus ou plasmide.</p>												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In. National Application No
PCT/FR 98/02107

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/34 C07K14/01 A61K39/12 A61K48/00 C12Q1/68
C07K16/08 G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N C07K A61K C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NAYAR G.P.S. ET AL.: "Detection and characterization of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs" CANADIAN VETERINARY JOURNAL - REVUE VETERINAIRE CANADIENNE, vol. 38, June 1997, pages 385-386, XP002068396 cited in the application see the whole document	1-7, 28, 29
Y		8-10, 23-26 27
A		
Y	WO 96 06619 A (PAUL PREM S. (US); MENG X.-J.; HALBUR P.; MOROZOV I.; LUM M.A.) 7 March 1996	8-10, 23-26
A	see abstract see page 189 - page 195; claims	18-22
		-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 January 1999

Date of mailing of the international search report

09/02/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Macchia, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

mande Internationale No

PCT/FR 98/02634

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6	C12N15/34	C12N15/86	C07K14/01	C12N7/04	C12N5/10
	C12N7/00	A01K67/027	C12Q1/68	C07K16/08	G01N33/569

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	MEEHAN B M ET AL: "SEQUENCE OF PORCINE CIRCOVIRUS DNA: AFFINITIES WITH PLANT CIRCOVIRUSES" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY., vol. 78, no. 1, janvier 1997, pages 221-227, XP002068398 READING GB cité dans la demande voir le document en entier ---- -/-	1-4, 6, 8-11, 13, 15, 16, 19, 21-24, 36, 38

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

3 juin 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

16/06/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Chambonnet, F

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 98/02634

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	MANKERTZ, A. ET AL.: "Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus" JOURNAL OF VIROLOGY., vol. 71, no. 3, mars 1997, pages 2562-2566, XP002078782 ICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY US cité dans la demande voir le document en entier ---	1-4, 6, 11, 13, 15, 16, 19, 21-24, 36, 38
P, X	HAMEL, A.L. ET AL.: "Nucleotide sequence of Porcine Circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 72, no. 6, juin 1998, pages 5262-5267, XP002078783 voir le document en entier ---	1
P, X	MEEHAN B M ET AL: "Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 79, no. 9, septembre 1998, pages 2171-2179, XP002090386 voir le document en entier ---	1
P, X	MOROZOV I ET AL: "Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 36, no. 9, septembre 1998, pages 2535-2541, XP002090921 voir le document en entier ---	1
P, A	ALLAN G M ET AL: "ISOLATION OF PORCINE CIRCOVIRUS-LIKE VIRUSES FROM PIGS WITH A WASTING DISEASE IN THE USA AND EUROPE" JOURNAL OF VETERINARY DIAGNOSTIC INVESTIGATION, vol. 10, janvier 1998, pages 3-10, XP002068503 voir le document en entier ---	1, 32
P, A	ELLIS J ET AL: "ISOLATION OF CIRCOVIRUS FROM LESIONS OF PIGS WITH POSTWEANING MULTISYSTEMIC WASTING SYNDROME" CANADIAN VETERINARY JOURNAL - REVUE VETERINAIRE CANADIENNE, vol. 39, janvier 1998, pages 44-51, XP002068502 voir page 50, colonne 1, alinéa 3 ---	1, 32
	-/--	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

andé Internationale No

PCT/FR 98/02634

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,A	<p>SEGALES J ET AL: "FIRST REPORT OF POST-WEANING MULTISYSTEMIC WASTING SYNDROME IN PIGS IN SPAIN" VETERINARY RECORD, vol. 141, no. 23, 6 décembre 1997, page 600/601 XP002068504 voir le document en entier ---</p>	1, 32
A	<p>TISCHER, I. ET AL.: "Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms" ARCHIVES OF VIROLOGY, vol. 140, no. 4, 1995, pages 737-743, XP002104704 voir le document en entier -----</p>	32, 33

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NR	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LJ	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

circovirus porcins, vaccins et réactifs de diagnostic

La présente invention est relative à de nouvelles souches de circovirus porcin (PCV pour *Porcine CircoVirus*) responsables du syndrome PMWS (*Porcine Multisystemic Wasting Syndrome* ou *Post-Weaning Multisystemic Wasting Syndrome* encore appelé syndrome de dépérissement généralisé de post-sevrage), à des réactifs et méthodes permettant leur détection, à des méthodes de vaccination et à des vaccins, ainsi qu'à des méthodes de production de ces réactifs et vaccins.

Le PCV a été à l'origine détecté comme contaminant non cytopathogène dans des lignées cellulaires de reins de porcs PK/15. Ce virus a été classé parmi les Circoviridae avec le virus de l'anémie du poulet (CAV pour *Chicken Anemia Virus*) et le virus PBFDV (*Pscittacine Beak and Feather Disease Virus*). Il s'agit de petits virus (de 15 à 24 nm) non enveloppés dont la caractéristique commune est de contenir un génome sous forme d'un ADN simple brin circulaire de 1,76 à 2,31 kb. On a d'abord pensé que ce génome codait pour un polypeptide d'environ 30 kDa (Todd et al., Arch Virol 1991, 117: 129-135). Des travaux récents ont toutefois montré une transcription plus complexe (Meehan B. M. et al., 1997, 78: 221-227). Par ailleurs, on ne connaît pas d'homologies significatives de séquence nucléotidique ni de déterminants antigéniques communs entre les trois types de circovirus connus.

Le PCV issu des cellules PK/15 est considéré comme n'étant pas pathogène. On en connaît la séquence d'après B. M. Meehan et al., J Gen Virol 1997 (78) 221-227. Ce n'est que très récemment que des auteurs ont pensé que des souches de PCV pourraient être pathogènes et associées au syndrome PMWS (Gopi P. S. Nayar et al., Can Vet J , vol. 38, 1997: 385-387 et Clark E. G., Proc Am Assoc Swine Prac 1997: 499-501). Nayar et al. ont détecté de l'ADN de PCV chez des porcs présentant le syndrome PMWS par des techniques de PCR. Aucune souche sauvage de PCV n'a toutefois été isolée et purifiée à ce jour.

Le syndrome PMWS détecté au Canada, aux Etats-Unis et en France

se caractérise au plan clinique par une perte progressive de poids et par des manifestations telles que tachypnée, dyspnée et jaunisse. Au plan pathologique, il se traduit par des infiltrations lymphocytaires ou granulomateuses, des lymphadénopathies et, plus rarement, par des hépatites et néphrites lymphocytaires ou granulomateuses (Clark E. G., Proc. Am. Assoc. Swine Prac. 1997: 499-501 ; La Semaine Vétérinaire n° 26, supplément à La Semaine Vétérinaire 1996 (834) ; La Semaine Vétérinaire 1997 (857): 54 ; Gupi P. S. Nayar et al., Can Vet J , vol. 38, 1997: 385-387).

La déposante a réussi à isoler cinq souches nouvelles de PCV à partir de prélèvements pulmonaires ou ganglionnaires provenant d'élevages situés au Canada, aux Etats-Unis (Californie) et en France (Bretagne), ci-après dénommés circovirus selon l'invention. Ces virus ont été mis en évidence dans des lésions de porcs atteints du syndrome PMWS, mais pas chez des porcs sains.

La déposante a en outre séquencé le génome de quatre de ces souches, à savoir les souches provenant du Canada et des Etats-Unis ainsi que deux souches française. Les souches présentent entre elles une très forte homologie au niveau nucléotidique dépassant 96 % et beaucoup plus faible avec la souche PK/15, environ 76 %. Les nouvelles souches peuvent donc être considérées comme représentatives d'un nouveau type de circovirus porcin, dénommé ici type II, le type I étant représenté par la PK/15.

La présente invention a donc pour objet le circovirus porcin de groupe II, tel que défini ci-dessus, isolé ou sous forme de préparation purifiée.

L'invention concerne tout circovirus porcin susceptible d'être isolé d'un échantillon physiologique ou d'un prélèvement tissulaire, notamment de lésions, d'un porc malade présentant le syndrome PMWS, notamment en suivant la méthode décrite dans les exemples, en particulier circovirus du type II.

La présente invention a plus particulièrement pour objet des

préparations purifiées de cinq souches, qui ont été déposées auprès de l'ECACC (European Collection of Cell Cultures, Centre for Applied Microbiology & Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, Royaume-Uni) le jeudi 2 octobre 1997:

- 5 - n° d'accès V97100219 (appelé ici Imp.1008PCV)
- n° d'accès V97100218 (appelé ici Imp.1010PCV)
- n° d'accès V97100217 (appelé ici Imp.999PCV).

et, le vendredi 16 janvier 1998 :

- 10 - n° d'accès V98 011608 (appelé ici Imp 1011-48285)
- n° d'accès V98 011609 (appelé ici Imp 1011-48121)

L'invention entend considérer les circovirus porcins isolés d'un porc malade et/ou les circovirus ayant une parenté sérologique significative avec les souches de l'invention et/ou les circovirus ayant une hybridation croisée avec les souches de l'invention dans des conditions de stringence telles qu'il n'y a pas d'hybridation avec la souche PCV PK/15.

15 Les souches virales isolées d'un échantillon physiologique ou d'un prélèvement tissulaire, notamment d'une lésion, d'un porc présentant le syndrome PMWS peuvent être avantageusement propagées sur des lignées cellulaires telles que notamment des lignées cellulaires de rein de porc, en particulier cellules PK/15 indemnes de contamination (en particulier pour PCV, ainsi que pour pestivirus, adénovirus porcin et parvovirus porcin) en vue de leur multiplication ou spécifiquement pour la production d'antigène, entier (e.g. virus) et/ou sous-unités (e.g. polypeptides).

20 De manière très remarquable et inattendue, ces isolats se sont révélés très productifs en culture sur cellules PK/15, ce qui présente des avantages indéniables pour la production de virus ou d'antigène, en particulier pour la production de vaccin inactivé.

25 La présente invention a aussi pour objet les préparations de circovirus isolés après passages sur cellules, notamment lignées cellulaires, e.g. cellules PK/15, cultivées *in vitro* en étant infectées par l'un au moins des circovirus

selon l'invention ou de tout circovirus porcin susceptible d'être isolé d'un échantillon physiologique ou d'un prélèvement tissulaire, notamment de lésions, d'un porc présentant le syndrome PMWS. Elle a aussi pour objet les surnageants ou extraits de culture, éventuellement purifiés par des techniques standards, et de manière générale toute préparation antigénique obtenue à partir des cultures *in vitro*.

L'invention a aussi pour objet les principes actifs immunogènes et les vaccins contenant au moins un antigène tel que défini supra.

Il peut s'agir de principes actifs immunogènes à base de virus entiers vivants atténus, ou vaccins préparés avec ces principes actifs, l'atténuation étant effectuée selon les méthodes usuelles, e.g. par passage sur cellules, de préférence par passage sur des cellules de porc, notamment lignées, telles que cellules PK/15 (par exemple de 50 à 150, notamment de l'ordre de 100, passages). Ces vaccins comprennent en général un véhicule ou diluant acceptable sur le plan vétérinaire, éventuellement un adjuvant acceptable sur le plan vétérinaire ainsi qu'éventuellement un stabilisateur de lyophilisation.

Ces préparations antigéniques et vaccins comprendront de préférence de 10^3 à 10^6 TCID₅₀.

Il peut aussi s'agir de principes actifs immunogènes ou de vaccins à base d'antigène de circovirus selon l'invention, à l'état inactivé. Les vaccins comprennent en outre un véhicule ou diluant acceptable sur le plan vétérinaire, avec éventuellement en plus un adjuvant acceptable sur le plan vétérinaire.

Les circovirus selon l'invention, avec les fractions qui peuvent être présentes, sont inactivés selon les techniques connues de l'homme du métier. L'inactivation sera effectuée de préférence par voie chimique, e.g. par exposition de l'antigène à un agent chimique tel que formaldéhyde (formol), paraformaldéhyde, β -propiolactone ou éthylène imine ou ses dérivés. La méthode d'inactivation préférée sera ici l'exposition à un agent chimique et en particulier à l'éthylène imine ou à la β -propiolactone.

De préférence, les vaccins inactivés selon l'invention seront adjuvés, avantageusement en étant présentés sous forme d'émulsions, par exemple eau-dans-l'huile ou huile-dans-l'eau, selon les techniques bien connues de l'homme du métier. Le caractère adjvant pourra aussi provenir de 5 l'incorporation au principe actif d'un composé adjvant usuel.

Parmi les adjuvants qui peuvent être utilisés, on peut citer à titre d'exemple l'hydroxyde d'alumine, les saponines (e.g. Quillaja saponin ou Quil A ; voir Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach, 1995, édité par Michael F. Powel et Mark J. Newman, Plenum Press, New-York and London, p 210), l'Avridine® (Vaccine Design p 148), le DDA (Diméthyldioctadécylammonium bromide, Vaccine Design p 157), le Polyphosphazene (Vaccine Design p 204), ou encore des émulsions huile-dans-l'eau à base d'huile minérale, de squalane (e.g. émulsion SPT, Vaccine Design p 147), de squalène (e.g. MF59, Vaccine Design p 183), ou eau-dans-l'huile à base d'huile métabolisable (de préférence selon WO-A-94 20071) ainsi que les émulsions décrites dans US-A-5 422 109. On peut aussi choisir 10 des associations d'adjuvants, par exemple Avridine® ou DDA associé à une émulsion.

Ces vaccins comprendront de préférence de 10^6 à 10^8 TCID50.

Les adjuvants du vaccin vivant pourront être choisis parmi ceux donnés pour le vaccin inactivé. On préférera les émulsions. A celles indiquées pour le vaccin inactivé, on peut rajouter celles décrites dans WO-A-9416681.

Comme stabilisateur de lyophilisation, on peut citer à titre d'exemple le SPGA (Bovarnik et al., J. Bacteriology 59, 509, 950), des hydrates de carbone tels que sorbitol, mannitol, amidon, saccharose, dextran ou glucose, des protéines telles que albumine ou caséine, des dérivés de ces composés, 25 ou des tampons tels que de phosphates de métaux alcalins.

La déposante a en outre obtenu le génome de quatre des isolats, identifiés SEQ ID NO: 1 à 4 et éventuellement 6.

La présente invention a donc pour objet un fragment d'ADN contenant tout ou partie de l'une de ces séquences. Il va de soi que l'invention recouvre automatiquement les séquences équivalentes, c'est-à-dire les séquences ne

changeant pas la fonctionnalité ni la spécificité de souche de la séquence décrite ni des polypeptides codés par cette séquence. Seront bien entendu incluses les séquences différant par dégénérescence du code.

5 L'invention recouvre également les séquences équivalentes en ce sens qu'elles sont capables de s'hybrider à la séquence supra dans des conditions de stringence élevées et/ou ont une forte homologie avec les souches de l'invention et appartiennent au groupe II défini plus haut.

10 Ces séquences et leurs fragments pourront avantageusement être utilisés pour l'expression *in vitro* ou *in vivo* de polypeptides à l'aide de vecteurs appropriés.

15 En particulier, des cadres ouverts de lecture, formant des fragments d'ADN selon l'invention, utilisables à cet effet ont été identifiés sur la séquence génomique des circovirus de type II. L'invention concerne tout polypeptide contenant au moins un de ces cadres ouverts de lecture (séquence en acides aminés correspondante). De préférence, l'invention concerne une protéine formée essentiellement par les COL4, COL7, COL10 ou COL13.

20 Pour l'expression de sous-unités *in vitro*, comme moyen d'expression on aura de préférence recours à *E. coli* ou au baculovirus (US-A-4 745 051). On intègre la ou les séquences codantes ou leurs fragments dans le génome du baculovirus (e.g. le baculovirus *Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus AcNPV*) et ce dernier est ensuite propagé sur cellules d'insectes, e.g. *Spodoptera frugiperda Sf9* (dépôt ATCC CRL 1711). On peut encore produire les sous-unités dans des cellules eucaryotes telles que levures (e.g. *Saccharomyces cerevisiae*) ou cellules de mammifères (e.g. CHO, BHK).

25 L'invention a aussi pour objet les polypeptides qui seront produits *in vitro* par ces moyens d'expression, puis éventuellement purifiés selon les techniques classiques. Elle a aussi pour objet les vaccins de sous-unité comprenant au moins un polypeptide tel qu'ainsi obtenu, ou fragment, dans un véhicule ou diluant acceptable sur le plan vétérinaire et éventuellement un adjuvant acceptable sur 30 le plan vétérinaire.

Pour l'expression *in vivo* en vue de la réalisation de vaccins vivants recombinants, on insère la ou les séquences codantes ou leurs fragments dans

un vecteur d'expression approprié dans des conditions permettant l'expression du ou des polypeptides. Comme vecteurs appropriés, on peut utiliser des virus vivants, de préférence capables de se multiplier chez le porc, non pathogènes pour le porc (naturellement non pathogène ou rendu tel), selon les techniques bien connues de l'homme du métier. On pourra notamment utiliser des herpèsvirus du porc tels que le virus de la maladie d'Aujeszky, l'adénovirus porcin, des poxvirus, notamment virus de la vaccine, avipox, canarypox, swinepox. On peut aussi utiliser comme vecteurs des ADN plasmidiques (WO-A-90 11092, WO-A-93 19813, WO-A-94 21797, WO-A-95 20660).

10 L'invention a donc aussi pour objet les vecteurs et les vaccins vivants recombinants ou plasmidiques (vaccins polynucléotidiques ou ADN) ainsi réalisés, les vaccins comprenant en outre un véhicule ou diluant acceptable sur le plan vétérinaire.

15 Les vaccins selon l'invention (vivants atténués, inactivés, sous-unités, vivants recombinants, plasmidiques) pourront comprendre un ou des principes actifs (antigènes) d'un ou de plusieurs (2 ou 3) des circovirus selon l'invention.

20 L'invention prévoit aussi d'associer, pour chacun des types de vaccins décrits ci-dessus, la vaccination contre le circovirus porcin à une vaccination contre d'autres pathogènes du porc, en particulier ceux pouvant être associés au syndrome PMWS. Les vaccins selon l'invention, notamment inactivés, pourront donc comprendre une autre valence correspondant à un autre pathogène du porc. Parmi ces autres pathogènes du porc, on peut citer de préférence le PRRS (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome) (l'homme du métier pourra se reporter à WO-A-93/07898, WO-A-94/18311, FR-A-2 709 966 ; C. Chareyre et al., Proceedings of the 15th IPVS Congress Birmingham, England, 5-9 juillet 1998, p 139 ; incorporés par référence) et/ou *Mycoplasma hyopneumoniae* (l'homme du métier pourra se reporter à EP-A-597 852, EP-A-550 477, EP-A-571 648, O. Martinon et al., p 157, p 284, p 285 et G. Reynaud et al., p 150 du Proceedings of the 15th IPVS Congress ci-dessus ; incorporés par référence).
25 Parmi les autres valences intéressantes, on peut encore citer *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *E. coli* et Rhinite atrophique du porc, ou encore maladie d'Aujeszky, peste porcine classique (Hog Cholera), grippe porcine.
30

La présente invention a aussi pour objet une méthode permettant d'induire une réponse immunitaire chez le porc vis-à-vis des circovirus selon l'invention. Elle a en particulier pour objet une méthode de vaccination efficace chez le porc.

Cette méthode prévoit l'administration au porc, en une ou plusieurs fois, 5 d'un vaccin supra. Il est aussi possible de combiner plusieurs types de vaccins supra dans un même protocole de vaccination.

Cette méthode prévoit non seulement l'administration aux porcs adultes, mais aussi aux jeunes ou aux femelles gestantes. La vaccination de ces dernières permet de conférer une immunité passive aux nouveau-nés (anticorps maternels).

10 La présente invention offre aussi la possibilité de diagnostiquer la présence des circovirus selon l'invention chez le porc. Elle a donc pour objet des tests de diagnostic et méthodes y relatives mettant en oeuvre les réactifs qui vont être décrits ci-après.

15 La connaissance des séquences des différents circovirus permet de définir des séquences communes qui permettent de produire des réactifs aptes à reconnaître l'ensemble des circovirus porcins connus.

L'homme du métier pourra aussi choisir des fragments des séquences correspondant à des régions présentant peu ou pas d'homologie avec la 20 séquence correspondante du circovirus PK/15 afin de pouvoir effectuer un diagnostic spécifique.

Les alignements de séquences permettent à l'homme du métier de choisir un réactif conforme à ses souhaits.

Un premier réactif consiste dans les séquences d'ADN divulguées ici et 25 leurs fragments, qui seront notamment utilisés comme sondes ou amorces dans des techniques d'hybridation ou de PCR ("Polymerase Chain Reaction") bien connues.

Un deuxième réactif consiste dans les polypeptides codés par ces 30 séquences à partir du virus ou exprimés à l'aide d'un vecteur (voir supra), ou synthétisés par voie chimique selon les techniques classiques de synthèse peptidique.

Un troisième et quatrième réactifs consistent dans des anticorps respectivement polyclonaux et monoclonaux qui pourront être produits selon les

techniques usuelles à partir du virus, des polypeptides ou fragments, extraits ou codés par les séquences d'ADN.

Ces deuxième, troisième et quatrième réactifs pourront être utilisés dans une méthode de diagnostic, objet de l'invention, dans laquelle l'on recherche, dans un échantillon de fluide physiologique (sang, plasma, sérum, etc.) ou prélèvement de tissu (ganglions, foie, poumons, reins, etc.) provenant d'un porc à tester, la présence d'un antigène spécifique d'un circovirus selon l'invention, en cherchant à détecter soit l'antigène lui-même, soit des anticorps dirigés contre cet antigène.

Les antigènes et anticorps selon l'invention pourront être utilisés dans toutes les techniques de diagnostic de laboratoire connues.

Toutefois, on préférera les mettre à profit dans des techniques pouvant être mises en œuvre directement sur le terrain par le vétérinaire, l'éleveur ou le propriétaire de l'animal. L'homme du métier dispose de l'ensemble des techniques de laboratoire et du terrain et est donc parfaitement en mesure de les adapter à l'utilisation de cet antigène et/ou des anticorps comme réactif(s) de diagnostic.

Les techniques de diagnostic qui seront préférentiellement utilisées dans le cadre de la présente invention sont le Western Blot, l'immunofluorescence, l'ELISA et l'immunochromatographie.

En ce qui concerne la mise en œuvre de méthodes par immunochromatographie, le spécialiste pourra se reporter notamment à Robert F. Zurk et al., Clin. Chem. 31/7, 1144-1150 (1985) ainsi qu'aux brevets ou demandes de brevet WO-A-88/08 534, WO-A-91/12528, EP-A-291 176, EP-A-299 428, EP-A-291 194, EP-A-284 232, US-A-5 120 643, US-A-5 030 558, US-A-5 266 497, US-A-4 740 468, US-A-5 266 497, US-A-4 855 240, US-A-5 451 504, US-A-5 141 850, US-A-5 232 835 et US-A-5 238 652.

Ainsi, l'on cherche de préférence à détecter les anticorps spécifiques dans l'échantillon par test indirect, par compétition ou par déplacement. Pour ce faire, on utilise l'antigène lui-même comme réactif de diagnostic, ou un fragment de cet antigène, conservant la reconnaissance des anticorps. Le marquage peut avantageusement être un marquage à la peroxydase ou un marquage particulaire, de préférence à l'or colloïdal.

On peut aussi chercher à détecter l'antigène lui-même dans l'échantillon à l'aide d'un anticorps marqué spécifique de cet antigène. Le marquage est avantageusement comme décrit ci-dessus.

Par anticorps spécifique de l'antigène utilisable notamment en compétition ou déplacement ou pour la détection de l'antigène lui-même, on entend anticorps monoclonaux et polyclonaux spécifiques de l'antigène, fragments de ces anticorps, de préférence fragments Fab ou F(ab)'₂.

Un autre aspect de l'invention est la production d'anticorps, polyclonaux ou monoclonaux, spécifiques de l'antigène conforme à l'invention, ces anticorps pouvant être ensuite utilisés notamment comme réactifs de diagnostic pour la détection de l'antigène dans un échantillon de fluide physiologique ou dans un prélèvement de tissu, ou même pour la détection d'anticorps présents dans un tel échantillon ou prélèvement. L'invention inclut aussi les fragments immunologiquement fonctionnels de ces anticorps, en particulier les fragments F(ab) et F(ab)'₂.

Des anticorps pourront être préparés par les techniques usuelles. On peut notamment se référer à Antibodies, A Laboratory Manual, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory, USA ou à J.W. Goding, Monoclonal Antibodies : Principles and Practice, Academic Press Inc., dont les contenus sont incorporés ici par référence.

On pourra notamment procéder, comme cela est connu en soi, à la fusion de cellules spléniques de souris immunisées par l'antigène ou par au moins l'un de ses fragments, avec des cellules myélomateuses adéquates.

L'invention a également pour objet une préparation, de préférence pure ou partiellement purifiée, ou même brute d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux spécifiques de l'antigène, notamment anticorps de souris ou de lapin.

La présente invention permet également de déterminer des épitopes d'intérêt notamment sur la base des séquences d'ADN décrites ici, que ce soient des épitopes d'intérêt vaccinal ou des épitopes d'intérêt en diagnostic. A partir de la séquence d'ADN du génome du circovirus selon l'invention, l'homme du métier est à même de déterminer des épitopes selon les méthodes connues par exemple programme informatique approprié ou PEPSCAN. Les épitopes sont

des régions immunodominantes de protéines et sont à ce titre des régions exposées à la surface des protéines. Ils peuvent être donc reconnus par des anticorps et ainsi être particulièrement employés dans le domaine du diagnostic soit pour la préparation d'anticorps à des fins de diagnostic soit pour la réalisation de peptides correspondants utilisables à titre de réactifs de diagnostic.

Au minimum, un épitope est un peptide ayant de 8 à 9 acides aminés. On préférera en général un minimum de 13 à 25 acides aminés.

L'homme du métier est donc en mesure, en utilisant l'une ou plusieurs de ces techniques ainsi que les autres techniques disponibles, de trouver des épitopes pour la mise en oeuvre de peptides ou d'anticorps à des fins de diagnostic.

L'invention a également pour objet un kit de diagnostic comportant cet antigène et/ou des anticorps polyclonaux ou monoclonaux spécifiques de cet antigène. Il s'agit en particulier de kits de diagnostic correspondants aux techniques de diagnostic décrites plus haut.

L'invention va être maintenant décrite plus en détail à l'aide d'exemples de réalisation non limitatifs, pris en référence au dessin, dans lequel :

Figure 1 : séquence d'ADN du génome de la souche Imp 1011-48121

Figure 2 : séquence d'ADN du génome de la souche Imp 1011-48285

Figure 3 : séquence d'ADN du génome de la souche Imp 999

Figure 4 : séquence d'ADN du génome de la souche Imp 1010

Figure 5 : alignement des 4 séquences selon les figures 1 à 4 avec la séquence de la souche PCV PK/15

Figure 6 : séquence d'ADN du génome de la souche Imp 999 telle que définie dans le premier dépôt en France du 3 octobre 1997

Figure 7 : Alignements de la séquence de la figure 6 avec la séquence de la souche PK/15

Liste des séquences SEQ ID

SEQ ID NO: 1 séquence d'ADN du génome de la souche Imp 1011-48121

SEQ ID NO: 2 séquence d'ADN du génome de la souche Imp 1011-48285

SEQ ID NO: 3 séquence d'ADN du génome de la souche Imp 999

- SEQ ID NO: 4** séquence d'ADN du génome de la souche Imp 1010
SEQ ID NO: 5 séquence d'ADN du génome de la souche PK/15
SEQ ID NO : 6 séquence d'ADN du génome de la souche Imp 999 telle que définie dans le premier dépôt en France du 3 octobre 1997.

5

EXEMPLES

Exemple 1 : Culture et isolement des souches de circovirus porcins:

Des échantillons de tissus ont été récoltés en France, au Canada et aux USA à partir de poumons et de ganglions lymphatiques de porcelets. Ces porcelets présentaient des signes cliniques typiques du syndrome de dépérissement généralisé de post-sevrage. Pour faciliter l'isolement des virus, les échantillons de tissus ont été congelés à -70°C immédiatement après autopsie.

Pour l'isolement viral, des suspensions contenant environ 15% d'échantillon de tissu ont été préparées dans un milieu minimum contenant des sels d'Earl (EMEM, BioWhittaker UK Ltd., Wokingham, UK), de la pénicilline (100 UI/ml) et de la streptomycine (100 µg/ml)(milieu MEM-SA), par broyage des tissus avec du sable stérile au moyen d'un mortier et d'un pilon stériles. Cette préparation broyée a été alors reprise dans du MEM-SA, puis centrifugée à 3000 g pendant 30 minutes à + 4°C pour récolter le surnageant.

Préalablement à l'ensemencement des cultures de cellules, un volume de 100 µl de chloroforme a été ajouté à 2 ml de chaque surnageant et mélangé en continu pendant 10 minutes à température ambiante. Ce mélange a alors été transféré dans un tube de microcentrifugeuse, centrifugé à 3000 g pendant 10 minutes, puis le surnageant a été récolté. Ce surnageant a été ensuite utilisé comme inoculum pour les expériences d'isolement viral.

Toutes les études d'isolement viral ont été réalisées sur des cultures de cellules PK/15, connues pour être non contaminées par le circovirus porcin (PCV), les pestivirus, les adénovirus porcins et le parvovirus porcin (Allan G. et al. Pathogenesis of porcine circovirus experimental infections of colostrum-deprived piglets and examination of pig foetal material. Vet. Microbiol. 1995. 44. 49-64).

L'isolement des circovirus porcins a été réalisé selon la technique suivante:

Des monocouches de cellules PK/15 ont été dissociées par trypsination

(avec un mélange trypsine-versène) à partir de cultures confluentes, et reprises en milieu MEM-SA contenant 15% de sérum foetal de veau non contaminé par du pestivirus (= milieu MEM-G) sous une concentration finale d'environ 400,000 cellules par ml. Des fractions aliquotes de 10 ml de cette suspension cellulaire ont alors été mélangées avec des fractions aliquotes de 2 ml des inoculums décrits ci-dessus, et les mélanges finaux ont été aliquotés en volumes de 6 ml dans deux flacons Falcon de 25 cm². Ces cultures ont alors été incubées à +37 °C pendant 18 heures en atmosphère contenant 10% de CO₂.

Après incubation, le milieu de culture des monocouches semi-confluentes a été traité avec 300 mM de D-glucosamine (Cat # G48175, Sigma-Aldrich Company Limited, Poole, UK) (Tischr I. et al., Arch. Virol. 1987 96 39-57), puis l'incubation a été poursuivie pendant une période supplémentaire de 48-72 heures à +37 °C. A la suite de cette dernière incubation, l'un des deux Falcons de chaque inoculum a subi 3 cycles successifs de congélation/décongélation. Les cellules PK/15 du Falcon restant ont été traitées avec une solution de trypsine-versène, resuspendues dans 20 ml de milieu MEM-G, puis ensemencées dans des Falcons de 75 cm² à une concentration de 400,000 cellules/ml. Les flacons fraîchement ensemencés ont alors été "surinfectés" par addition de 5 ml du lysat correspondant obtenu après les cycles de congélation/décongélation.

Exemple 2 : Préparation des échantillons de culture cellulaire pour détection des circovirus porcins par immunofluorescence ou par hybridation *in situ*.

Un volume de 5 ml de la suspension "surinfectée" a été prélevé et ensemencé dans une boîte de Petri de 55 mm de diamètre contenant une lamelle de verre stérile et dégraissée. Les cultures en flacons et sur lamelles de verre ont été incubées à +37 °C et traitées à la glucosamine comme décrit dans l'exemple 1. Les cultures sur lamelles de verre ont été récoltées de 24 à 48 heures après le traitement à la glucosamine et fixées, soit avec de l'acétone pendant 10 minutes à température ambiante, soit avec 10% de formaldéhyde tamponné pendant 4 heures. Suite à cette fixation, toutes les lamelles de verre ont été stockées à -70 °C, sur gel de silice, avant leur utilisation pour les études d'hybridation *in situ* et les études de marquage immunocytochimique.

Exemple 3 : Techniques de détection de séquences PCV par hybridation *in situ*

L'hybridation *in situ* a été réalisée sur les tissus prélevés sur les porcs malades et fixés au formaldéhyde et également sur les préparations de cultures de cellules inoculées pour l'isolement viral (voir exemple 2) et fixées sur lameilles de verre.

Des sondes génomiques complètes correspondant aux circovirus porcin PK/15 (PCV) et au virus de l'anémie infectieuse du poulet (chicken anemia virus = CAV) ont été utilisées. Le plasmide pPCV1, contenant la forme réplicative du génome PCV clonée sous la forme d'un insert unique de 1,7 kilopaires de bases (kpb) (Meehan B. *et al.* Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. J. Gen. Virol. 1997. 78. 221-227) a été utilisé comme source

10 d'ADN viral spécifique pour PCV. Un plasmide analogue, pCAA1, contenant la forme réplicative 2,3 kpb du circovirus aviaire CAV a été utilisé comme contrôle négatif. Les stocks de glycérols respectifs de ces deux plasmides ont été utilisés pour la production et la purification des plasmides selon la technique de lyse 15 alcaline (Sambrook J. *et al.* Molecular cloning : A Laboratory Manual. 2nd Édition. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York. 1989) afin qu'ils servent ensuite de matrices pour la préparation des sondes. Les sondes circovirus 20 représentatives des génomes complets du PCV et de CAV ont été produites à partir des plasmides purifiés décrits ci-dessus (1 µg pour chaque sonde) et d'amorces hexanucléotidiques au hasard en utilisant un kit commercial de marquage non radioactif ("DIG DNA labelling kit", Boehringer Mannheim, Lewes, UK) selon les recommandations du fournisseur.

Les sondes marquées à la digoxigénine ont été reprises sous un volume de 25 50-100 µl d'eau stérile avant leur utilisation pour l'hybridation *in situ*.

Les échantillons de tissus de porcs malades, inclus dans la paraffine et fixés au formaldéhyde, ainsi que les préparations de cultures de cellules infectées, fixées au formaldéhyde, ont été préparées pour la détection des acides nucléiques PCV selon la technique suivante :

30 Des sections de 5 µm d'épaisseur ont été découpées à partir des blocs de tissus inclus dans la paraffine, déparaffinés, puis réhydratés dans des solutions successives d'alcool à concentration décroissante. Les sections de tissus et les

cultures de cellules fixées au formaldéhyde ont été incubées respectivement pendant 15 minutes et 5 minutes à +37 °C dans une solution de protéinase K à 0,5% en tampon Tris-HCl 0,05M, EDTA 5 mM (pH 7,6). Les lames ont été alors placées dans une solution de glycine à 1% en eau distillée autoclavée, pendant 5 30 secondes, lavées deux fois avec un tampon PBS (phosphate buffer saline) 0,01 M (pH 7,2), et enfin lavées pendant 5 minutes en eau distillée stérile. Elles ont été finalement séchées à l'air libre et mises en contact avec les sondes.

Chaque préparation tissu/sonde a été recouverte avec une lamelle propre et dégraissée, puis placée dans un four à +90°C pendant 10 minutes, mise 10 ensuite en contact avec un bloc de glace pendant 1 minute, et enfin incubée pendant 18 heures à +37°C. Les préparations ont été ensuite immersées brièvement dans un tampon sel de sodium-citrate (SSC) 2X (pH 7,0) pour éliminer les lamelles protectrices, puis lavées 2 fois pendant 5 minutes en tampon SSC 2X et enfin lavées 2 fois pendant 5 minutes en tampon PBS.

15 Après ces lavages, les préparations ont été immersées dans une solution d'acide maléique 0,1 M, NaCl 0,15 M (pH 7,5) (tampon maléique) pendant 10 minutes, puis incubées dans une solution de 1% de réactif bloquant (Cat # 1096176, Boehringer Mannheim UK, Lewis, East Sussex, UK) en tampon maléique pendant 20 minutes à +37 °C.

20 Les préparations ont alors été incubées avec une solution au 1/250 d'un anticorps monoclonal anti-digoxigénine (Boehringer Mannheim), dilué en tampon bloquant, pendant 1 heure à +37 °C, lavées en PBS et enfin incubées avec un anticorps biotinylé anti-immunoglobuline de souris pendant 30 minutes à +37 °C. Les préparations ont été lavées en PBS et l'activité peroxydase endogène a été 25 bloquée par un traitement avec une solution de peroxyde d'hydrogène à 0,5% en PBS pendant 20 minutes à température ambiante. Les préparations ont été lavées une nouvelle fois en PBS et traitées avec un substrat 3-amino-9-diéthylcarbazole (AEC) (Cambridge Bioscience, Cambridge, UK) préparé extemporanément.

30 Après un dernier lavage à l'eau de ville, les préparations ont été contre-colorées avec de l'hématoxyline, "bleuies" sous eau de ville, et montées sous lamelles microscopiques avec un liquide de montage (GVA Mount, Cambridge Bioscience, Cambridge, UK). Les contrôles d'expérience ont inclus l'utilisation

d'une sonde négative non pertinente (CAV) et d'une sonde positive (PCV) sur des échantillons provenant de porcs malades et de porcs non malades.

Exemple 4 : Technique de détection du PCV par immunofluorescence

5 Le criblage initial de toutes les préparations de culture cellulaire fixées à l'acétone a été réalisé par une technique d'immunofluorescence indirecte (IFI) utilisant une dilution au 1/100 d'un pool de sérums de porcs adultes. Ce pool de sérums comprend des sérums de 25 truies adultes d'Irlande du Nord et est connu pour contenir des anticorps contre une grande variété de virus porcins, y compris
10 PCV : parvovirus porcin, adénovirus porcin, et virus PRRS. La technique IFI a été réalisée par un contact du sérum (dilué en PBS) avec les cultures cellulaires pendant une heure à +37 °C, suivi de deux lavages en PBS. Les cultures de cellules sont alors colorées avec une dilution au 1/80 en PBS d'un anticorps de lapin anti-immunoglobuline de porc conjugué à de l'isothiocyanate de fluorescéine
15 pendant une heure, puis lavées en PBS et montées en tampon glycérol préalablement à l'observation microscopique sous éclairage ultra-violet.

Exemple 5 : Résultats de l'hybridation *in situ* sur les tissus de porcs malades

20 L'hybridation *in situ*, utilisant une sonde génomique PCV, réalisée sur des tissus prélevés sur des porcelets français, canadiens et californiens présentant des lésions de dépérissement généralisé et fixés au formaldéhyde, a révélé la présence d'acides nucléiques PCV associés aux lésions, dans plusieurs des lésions étudiées. Aucun signal n'a été observé lorsque la sonde génomique PCV a été utilisée sur des tissus prélevés sur des porcs non malades ou lorsque la
25 sonde CAV a été utilisée sur les tissus de porcs malades. La présence d'acide nucléique PCV a été identifiée dans le cytoplasme et le noyau de nombreuses cellules mononucléaires infiltrant les lésions dans les poumons des porcelets californiens. La présence d'acide nucléique PCV a également été mise en évidence dans les pneumocytes, les cellules épithéliales bronchiques et
30 bronchiolaires, et dans les cellules endothéliales des petites artéries, veinules et vaisseaux lymphatiques.

Chez les porcs malades français, la présence d'acide nucléique PCV a été

détectée dans le cytoplasme de nombreux lymphocytes folliculaires et dans les cellules mononucléaires intrasinusoïdales des ganglions lymphatiques. L'acide nucléique PCV a également été détecté dans des syncytia occasionnels. En fonction de ces résultats de détection, des échantillons de poumons de porcs californiens, de ganglions lymphatiques mésentériques de porcs français, et d'organes de porcs canadiens ont été choisis aux fins d'isolement des nouvelles souches de circovirus porcin.

5

Exemple 6 : Résultats de la culture cellulaire des nouvelles souches de circovirus porcin et détection par immunofluorescence

10

Aucun effet cytopathique (ECP) n'a été observé dans les cultures de cellules inoculées avec les échantillons prélevés sur les porcelets français (souche Imp.1008), californiens (souche Imp.999) et canadiens (souche Imp.1010) montrant des signes cliniques du syndrome du dépérissement généralisé. 15 Cependant, l'immuno-marquage des préparations provenant des cultures de cellules inoculées, après fixation à l'acétone et avec un pool de sérum polyclonaux de porcs, a révélé une fluorescence nucléaire chez de nombreuses cellules dans les cultures inoculées à partir des poumons de porcelets californiens (souche Imp.999), à partir des ganglions lymphatiques médiastinaux des porcelets français (souche Imp.1008), et à partir d'organes des porcelets canadiens (souche Imp.1010).

15

20

Exemple 7 : Extraction de l'ADN génomique des circovirus porcins

Les formes réplicatives des nouvelles souches de circovirus porcin (PCV) ont été préparées à partir de cultures de cellules PK/15 infectées (voir exemple 25 1) (10 Falcons de 75 cm²) récoltées après 72-76 heures d'incubation et traitées à la glucosamine, comme décrit pour le clonage de la forme réplicative du CAV (Todd. D. *et al.* Dot blot hybridization assay for chicken anemia agent using a cloned DNA probe. J. Clin. Microbiol. 1991. 29. 933-939). L'ADN double brin de ces formes réplicatives a été extrait selon une modification de la technique de Hirt 30 (Hirt B. Selective extraction of polyoma virus DNA from infected cell cultures. J. Mol. Biol. 1967. 36. 365-369), comme décrit par Molitor (Molitor T.W. *et al.*

Porcine parvovirus DNA: characterization of the genomic and replicative form DNA of two virus isolates. *Virology*. 1984. 137. 241-254).

Exemple 8 : Carte de restriction de la forme réplicative du génome de la souche Imp.999 de circovirus porcin.

L'ADN (1-5 µg) extrait selon la technique de Hirt a été traité par la nucléase S1 (Amersham) selon les recommandations du fournisseur, puis cet ADN a été digéré par différentes enzymes de restriction (Boehringer Mannheim, Lewis, East Sussex, UK) et les produits de la digestion ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% en présence de bromure d'éthidium comme décrit par Todd *et al.* (Purification and biochemical characterization of chicken anemia agent. *J. Gen. Virol.* 1990. 71. 819-823).

L'ADN extrait des cultures de la souche Imp.999 possède un site unique EcoRI, 2 sites SacI et ne possède pas de site PstI. Ce profil de restriction est donc différent du profil de restriction présenté par la souche PCV PK/15 (Meehan B. *et al.* Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. 1997. 78. 221-227) qui possède au contraire un site PstI et ne possède pas de site EcoRI.

Exemple 9 : Clonage du génome de la souche Imp.999 de circovirus porcin

Le fragment de restriction d'environ 1,8 kpb généré par digestion de la forme réplicative double brin de la souche PCV Imp.999 avec l'enzyme de restriction EcoRI a été isolé après électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% (voir exemple 3) en utilisant un kit commercial Qiagen (QIAEXII Gel Extraction Kit, Cat # 20021, QIAGEN Ltd., Crawley, West Sussex, UK). Ce fragment de restriction EcoRI-EcoRI a été ensuite ligaturé avec le vecteur pGEM-7 (Promega, Medical Supply Company, Dublin, Ireland), préalablement digéré par les mêmes enzymes de restriction et déphosphorylé, en suivant les techniques standards de clonage (Sambrook J. *et al.* Molecular cloning : A Laboratory Manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York. 1989). Les plasmides obtenus ont été transformés dans une souche hôte *Escherichia coli* JM109 (Stratagene, La Jolla, USA) selon les techniques standards. Le fragment de

restriction EcoRI-EcoRI de la souche PCV Imp.999 a également été cloné dans le site EcoRI du vecteur pBlueScript SK + (Stratagene Inc. La Jolla, USA). Parmi les clones obtenus pour chaque souche hôte, au moins 2 clones contenant les fragments de la taille attendue ont été sélectionnés. Les clones obtenus ont alors été cultivés et les plasmides contenant le génome complet de la souche Imp.999 ont été purifiés en petit volume (2 ml) ou en grand volume (250 ml) selon les techniques standards de préparation et de purification des plasmides.

10 **Exemple 10 : Séquençage de l'ADN génomique (forme réplicative double brin) de la souche PCV Imp.999.**

La séquence nucléotidique de 2 clones EcoRI Imp.999 (clones pGEM-7/2 et pGEM-7/8) a été déterminée selon la technique des didéoxynucléotides de Sanger en utilisant le kit de séquençage "AmpliTaq DNA polymerase FS" (Cat # 402079 PE Applied Biosystems, Warrington, UK) et un appareil de séquençage automatique Applied BioSystems ABI373A selon les recommandations du fournisseur. Les réactions de séquençage initiales ont été faites avec les primers universels M13 "forward" et "reverse". Les réactions de séquençage suivantes ont été générées selon la technique de "marche sur l'ADN". Les oligonucléotides nécessaires à ces séquençages ultérieurs ont été synthétisés par Life Technologies (Inchinnan Business Park, Paisley, UK).

25 Les séquences générées ont été assemblées et analysées au moyen du logiciel MacDNASIS version 3.2. (Cat # 22020101, Appligene, Durham, UK). Les différents cadres ouverts de lecture ont été analysés au moyen de l'algorithme BLAST disponible sur le serveur du "National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA).

La séquence complète (fragment EcoRI-EcoRI) obtenue initialement à partir du clone pGEM-7/8 (SEQ ID NO : 6) est présentée sur la figure N°6. Elle débute arbitrairement après le G du site EcoRI et présente quelques incertitudes sur le plan des nucléotidiques.

30 Le séquençage a ensuite été optimisé et la SEQ ID NO : 3 (Figure 3) donne la séquence totale de cette souche, que l'on a fait débuté arbitrairement au début du site EcoRI, soit le G comme premier nucléotide.

On a procédé d'une manière similaire pour l'obtention de la séquence des trois autres isolats selon l'invention (voir SEQ ID NO : 1, 2 et 4 et figures 1, 2 et 4).

La taille du génome de ces quatre souches est :

5 Imp 1011-48121 1767 nucléotides
 Imp 1011-48285 1767 nucléotides
 Imp 999 1768 nucléotides
 Imp 1010 1768 nucléotides

10 **Exemple 11 : Analyse de la séquence de la souche PCV Imp.999.**

Lorsque la séquence générée à partir de la souche Imp.999 a été utilisée pour une recherche d'homologie vis-à-vis des séquences contenues dans la banque de données GenBank, la seule homologie significative qui ait été détectée est une homologie d'environ 76 % (au niveau acide nucléique) avec la séquence 15 de la souche PK/15 (Numéros d'accès Y09921 et U49186) (voir figure N°5).

Au niveau acides aminés, la recherche d'homologie de la traduction des séquences dans les 6 phases avec les banques de données (algorithme BLAST X sur le serveur NCBI) a permis de mettre en évidence une homologie de 94 % avec le cadre ouvert de lecture correspondant à la réplique théorique du virus 20 BBTV similaire aux circovirus de plantes (numéro d'identification GenBank 1841515) codée par la séquence GenBank U49186.

Aucune autre séquence contenue dans les banques de données ne montre d'homologie significative avec la séquence générée à partir de la souche PCV Imp.999.

25 L'analyse des séquences obtenues à partir de la souche Imp.999 cultivée à partir de lésions prélevées sur des porcelets californiens présentant des signes cliniques du syndrome de dépérissement généralisé montre clairement que cet isolat viral est une nouvelle souche de circovirus porcin.

30 **Exemple 12 : Analyse comparative des séquences**

L'alignement des séquences nucléotidiques des 4 nouvelles souches PCV a été fait avec la séquence de la souche PCV PK/15 (figure 5). Une matrice

d'homologie prenant en compte les quatre nouvelles souches et la souche antérieure PK/15 a été réalisée. Les résultats sont les suivants :

1 : Imp 1011-48121

2 : Imp 1011-48285

5 3 : Imp 999

4 : Imp 1010

5 : PK/15

	1	2	3	4	5
10	1,0000	0,9977	0,9615	0,9621	0,7600
15	2	1,0000	0,9621	0,9632	0,7594
20	3		1,0000	0,9949	0,7560
25	4			1,0000	0,7566
30	5				1,0000

L'homologie entre les deux souches françaises Imp 1011-48121 et Imp 1011-48285 est supérieure à 99 % (0,9977).

L'homologie entre les deux souches nord-américaines Imp 999 et Imp 1010 est aussi supérieure à 99 % (0,9949). L'homologie entre souches françaises et souches nord-américaines est un peu supérieure à 96 %.

L'homologie de toutes ces souches avec PK/15 tombe à une valeur comprise entre 75 et 76 %.

On en déduit que les souches selon l'invention sont représentatives d'un nouveau type de circovirus porcin, distinct du type représenté par la souche PK/15. Ce nouveau type, isolé de porcs présentant le syndrome PMWS, est dénommé circovirus porcin de type II, la PK/15 représentant le type I. Les souches appartenant à ce type II présentent une remarquable homogénéité de séquence nucléotidique, alors même qu'elles ont été isolées dans des régions géographiques très éloignées.

30

Exemple 13 : Analyse des protéines codées par le génome des nouvelles souches PCV.

La séquence nucléotidique de l'isolat Imp. 1010 a été considérée comme représentative des autres souches de circovirus associées au syndrome de dépréssissement généralisé. Cette séquence a été analysée plus en détail à l'aide de l'algorithme BLASTX (Altschul *et al.* J. Mol. Biol. 1990, 215, 403-410) et d'une combinaison de programmes de l'ensemble de logiciels MacVector 6.0 (Oxford Molecular Group, Oxford OX4 4GA, UK). Il a été possible de détecter 13 cadres ouverts de lecture (ou COLs) d'une taille supérieure à 20 acides aminés sur cette séquence (génome circulaire). Ces 13 COLs sont les suivants :

	Nom	Début	Fin	Brin	Taille du COL (nucléotides (nt))	Taille protéine (acides aminés (aa))
10	COL1	103	210	sens	108 nt	35 aa
	COL2	1180	1317	sens	138 nt	45 aa
	COL3	1363	1524	sens	162 nt	53 aa
15	COL4	398	1342	sens	945 nt	314 aa
	COL5	900	1079	sens	180 nt	59 aa
	COL6	1254	1334	sens	81 nt	26 aa
	COL7	1018	704	antisens	315 nt	104 aa
	COL8	439	311	antisens	129 nt	42 aa
	COL9	190	101	antisens	90 nt	29 aa
20	COL10	912	733	antisens	180 nt	59 aa
	COL11	645	565	antisens	81 nt	26 aa
	COL12	1100	1035	antisens	66 nt	21 aa
	COL13	314	1381	antisens	702 nt	213 aa

25 Les positions de début et de fin de chaque COL se réfèrent à la séquence présentée sur la figure N° 4 (SEQ ID N° 4), du génome de la souche 1010. Les limites des COLs 1 à 13 sont identiques pour la souche 999. Elles le sont aussi pour les souches 1011-48121 et 1011-48285, sauf pour les COLs 3 et 13 :
COL3 1432-1539, sens, 108 nt, 35aa
30 COL13 314-1377, antisens, 705 nt, 234 aa.

Parmi ces 13 COLs, 4 présentent une homologie significative avec des

COLs analogues situés sur le génome du virus cloné PCV PK-15. Chacun des cadres ouverts de lecture présents sur le génome de tous les isolats de circovirus associés au syndrome de dépérissement généralisé a été analysé. Ces 4 COLs sont les suivants :

5

10

Nom	Début	Fin	Brin	Taille du COL (nt)	Taille protéine (acides aminés)	Masse moléculaire
COL4	398	1342	sens	945 nt	314 aa	37,7 kDa
COL7	1018	704	antisens	315 nt	104 aa	11,8 kDa
COL10	912	733	antisens	180 nt	59 aa	6,5 kDa
COL13	314	1381	antisens	702 nt	233 aa	27,8 kDa

Les positions de début et de fin de chaque COL se réfèrent à la séquence présentée sur la figure N° 4 (SEQ ID N° 4). La taille du COL (en nucléotides = nt) inclut le codon stop.

15

La comparaison entre l'organisation génomique des isolats PCV Imp. 1010 et PCV PK-15 a permis l'identification de 4 COLs conservés dans le génome des deux virus. Le tableau ci-dessous présente les degrés d'homologie observés:

COL Imp.1010/COL PCV PK-15	Pourcentage d'homologie
COL4/COL1	86 %
COL13/COL2	66,4 %
COL7/COL3	61,5 % (au niveau du recouvrement (104 aa))
COL10/COL4	83 % (au niveau du recouvrement (59 aa))

20

La plus grande identité de séquence a été observée entre le COL4 Imp. 1010 et le COL1 PK-15 (86% d'homologie). Ceci était attendu dans la mesure où cette protéine est probablement impliquée dans la réPLICATION de l'ADN viral et est essentielle pour la réPLICATION virale (Meehan *et al.* J. Gen. Virol. 1997. 78. 221-227; Mankertz *et al.* J. Gen. Virol. 1998. 79. 381-384).

L'identité de séquence entre le COL13 Imp. 1010 et le COL2 PK-15 est

moins forte (66,4% d'homologie), mais chacun de ces deux COLs présente bien une région basique N-terminale très conservée, qui est identique à la région N-terminale de la protéine structurale majeure du circovirus aviaire CAV (Meehan *et al.* Arch. Virol. 1992. 124. 301-319). De plus grandes différences sont 5 observées entre COL7 Imp. 1010 et COL3 PK-15 et entre COL10 Imp. 1010 et COL4 PK-15. Dans chaque cas, il existe une délétion de la région C-terminale des COL7 et COL10 de l'isolat Imp. 1010 lorsqu'on les compare aux COL3 et COL4 de PCV PK-15. La plus haute homologie de séquence est observée au niveau des 10 régions N-terminales de COL7/COL3 (61,5% d'homologie au niveau du recouvrement) et de COL10/COL4 (83% d'homologie au niveau du recouvrement).

Il apparaît que l'organisation génomique du circovirus porcin est assez complexe suite à l'extrême compacité de son génome. La protéine structurale majeure est probablement issue d'un épissage entre plusieurs cadres de lecture 15 situés sur le même brin du génome du circovirus porcin. On peut donc considérer que tout cadre ouvert de lecture (COL1 à COL13) tel que décrit dans le tableau ci-dessus, peut représenter tout ou partie d'une protéine antigénique codée par le circovirus porcin de type II et est donc potentiellement un antigène utilisable pour le diagnostic spécifique et/ou pour la vaccination. L'invention concerne donc 20 toute protéine comprenant au moins un de ces COLs. De préférence, l'invention concerne une protéine formée essentiellement par les COL4, COL7, COL10 ou COL13.

Exemple 14 : Caractère infectieux du génome PCV cloné à partir des nouvelles 25 souches.

Le plasmide pGEM-7/8 contenant le génome complet (forme réplicative) de l'isolat Imp.999 a été transfecté dans des cellules PK/15 selon la technique décrite par Meehan B. *et al.* (Characterization of viral DNAs from cells infected with chicken anemia agent : sequence analysis of the cloned replicative form and 30 transfection capabilities of cloned genome fragments. Arch. Virol. 1992. 124. 301-319). L'analyse par immunofluorescence (voir exemple 4) réalisée sur le premier passage après transfection sur cellules PK/15 non contaminées a montré

que le plasmide du clone pGEM7/8 était capable d'induire la production de virus PCV infectieux. La disponibilité d'un clone contenant un matériel génétique PCV infectieux permet toute manipulation utile sur le génome viral afin de produire des virus PCV modifiés (soit atténués chez le porc, soit défectifs) utilisables pour la 5 production de vaccins atténués ou recombinés, ou pour la production d'antigènes pour des trousse de diagnostic.

Exemple 15 : Production des antigènes PCV par culture *in vitro*

La culture des cellules PK/15 non contaminées et la multiplication virale 10 sont réalisées selon les mêmes modalités qu'à l'exemple 1. Les cellules infectées sont récoltées après trypsination après 4 jours d'incubation à 37 °C et numérées. Le passage suivant est inoculé avec 400 000 cellules infectées par ml.

Exemple 16 : Inactivation des antigènes viraux

15 En fin de culture virale, les cellules infectées sont récoltées et lysées par ultrasons (Branson Sonifier) ou à l'aide d'un broyeur colloïdal de type rotor-stator (UltraTurrax, IKA). La suspension est ensuite centrifugée à 3700 g pendant 30 minutes. La suspension virale est inactivée par 0,1 % d'éthylène imine pendant 18 heures à + 37°C ou par 0,5 % de bêta-propiolactone pendant 24 heures à 20 + 28°C. Si le titre du virus avant inactivation est insuffisant, la suspension virale est concentrée par ultrafiltration en utilisant une membrane avec un seuil de coupure de 300 kDa (Millipore PTMK300). La suspension virale inactivée est conservée à + 5°C.

25 **Exemple 17 : Préparation du vaccin sous forme d'émulsion à base d'huile minérale.**

Le vaccin est préparé selon la formule suivante :

- suspension de circovirus porcin inactivé : 250 ml
- Montanide® ISA 70 (SEPPIC): 750 ml

30 La phase aqueuse et la phase huileuse sont stérilisées séparément par filtration. L'émulsion est préparée par mélange et homogénéisation des ingrédients à l'aide d'un émulseur à turbine Silverson.

Une dose de vaccin contient environ $10^{7.5}$ DICT50. Le volume d'une dose de vaccin est de 0,5 ml pour administration par voie intradermique, et de 2 ml pour administration par voie intramusculaire.

Exemple 18 : Préparation du vaccin sous forme d'émulsion à base d'huile métabolisable.

Le vaccin est préparé selon la formule suivante :

- suspension de circovirus porcin inactivé : 200 ml
- Dehymuls HRE 7 (Henkel) : 60 ml
- Radia 7204 (Olefina) : 740 ml

La phase aqueuse et la phase huileuse sont stérilisées séparément par filtration. L'émulsion est préparée par mélange et homogénéisation des ingrédients à l'aide d'un émulseur à turbine Silverson.

Une dose de vaccin contient environ $10^{7.5}$ DICT50. Le volume d'une dose de vaccin est de 2 ml pour administration par voie intramusculaire.

15

Exemple 19 : Résultats d'immunofluorescence indirecte vis-à-vis des souches de virus PCV US et française et du contaminant PK/15 avec un sérum hyperimmun (PCV-T), un panel d'anticorps monoclonaux F99, préparés à partir de PK/15 et un sérum hyperimmun préparé à partir de la souche canadienne (PCV-C)

20

25

30

VIRUS			
	PK/15	USA	France
5	PCV-T antiserum	≥ 6 400	200
	PCV-C antiserum	200	≥ 6,400
	F99 1H4	≥ 10 000	< 100
	F99 4B10	≥ 10 000	< 100
	F99 2B7	≥ 10 000	100
	F99 2E12	≥ 10 000	< 100
	F99 1C9	≥ 10 000	< 100
	F99 2E1	≥ 10 000	< 100
	F99 1H4	≥ 10 000	100

15 * inverse de la dernière dilution du sérum ou de l'anticorps monoclonal qui donne une réaction positive en immunofluorescence indirecte.

20

25

30

REVENDICATIONS

1. Préparation purifiée de circovirus porcin de type II.

5

2. Préparation purifiée de circovirus porcin choisie dans le groupe consistant dans les préparations déposées auprès de l'ECACC, sous les références suivantes:

- n° d'accès V97100219
- n° d'accès V97100218
- n° d'accès V97100217
- n° d'accès V98011608
- n° d'accès V98011609.

15 3. Préparation de circovirus porcin produit sur, et isolé de cellules en culture cellulaire *in vitro*, ces cellules ayant été infectées par un circovirus porcin susceptible d'être isolé d'un échantillon physiologique ou d'un prélèvement tissulaire, notamment de lésions, d'un porc présentant le syndrome PMWS.

20 4. Préparation de circovirus porcin selon la revendication 3, produit sur, et isolé d'une lignée cellulaire de rein de porc.

25 5. Préparation selon la revendication 4, produit sur, et isolé de cellules PK/15 indemnes de contamination par PCV.

6. Extrait ou surnageant de culture recueilli d'une culture cellulaire *in vitro* de cellules que l'on a infectées à l'aide d'un circovirus selon la revendication 1.

30 7. Préparation antigénique recueillie d'une culture cellulaire *in vitro* de cellules que l'on a infectées à l'aide d'un circovirus selon la revendication 1.

8. Vaccin comprenant une préparation antigénique selon la revendication

7, ou un surnageant ou extrait de cultures selon la revendication 6, comprenant du circovirus porcin comme antigène.

5 9. Vaccin selon la revendication 8, caractérisé en ce que le vaccin comprend de l'antigène entier vivant atténué, dans un véhicule ou diluant acceptable sur le plan vétérinaire et éventuellement un adjuvant acceptable sur le plan vétérinaire ainsi qu'éventuellement un stabilisateur de lyophilisation.

10. Vaccin selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'antigène est
10 inactivé et le vaccin comprend en outre un véhicule ou diluant acceptable sur le
plan vétérinaire et éventuellement un adjuvant acceptable sur le plan vétérinaire.

11. Fragment d'ADN contenant une séquence choisie dans le groupe
consistant dans les séquences référencées SEQ ID NO : 1

20 12. Fragment d'ADN contenant un COL choisi dans le groupe consistant
en COLs 1 à 13.

13. Fragment d'ADN selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il contient un COL choisi dans le groupe consistant en les COLs 4, 7, 10 et 13.

25
14. Polypeptide codé par un fragment d'ADN selon l'une des revendications 11 à 13

15. Vecteur d'expression *in vitro* comprenant, intégré dans son génome,
une séquence ou fragment d'ADN selon l'une des revendications 11 à 13, de
manière à pouvoir être exprimée *in vitro*.

16. Vecteur d'expression selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi *E. coli* et baculovirus.

5 17. Polypeptides produits par un vecteur d'expression selon la revendication 15 ou 16, éventuellement purifiés.

18. Vaccin de sous-unité, comprenant au moins un polypeptide selon la revendication 14 ou 17 dans un diluant ou véhicule acceptable sur le plan vétérinaire, et éventuellement un adjuvant acceptable sur le plan vétérinaire.

10

19. Vecteur d'expression *in vivo* comprenant, intégré dans son génome, un fragment d'ADN selon l'une des revendications 11 à 13, de manière à pouvoir l'exprimer *in vivo*.

15

20. Vecteur d'expression selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les virus vivants capables de se multiplier chez le porc sans être pathogènes pour cet animal, et les plasmides.

20

21. Vecteur d'expression selon la revendication 20, caractérisé en ce que le vecteur viral est choisi parmi les herpès virus du porc, tel que le virus de la maladie d'Aujeszky, l'adénovirus porcin, les poxvirus, notamment le virus de la vaccine, l'avipox, le canarypox, le swinepox.

25

22. Vaccin vivant ou plasmidique, caractérisé en ce qu'il comprend un vecteur d'expression selon l'une des revendications 19 à 21 dans un véhicule ou diluant acceptable sur le plan vétérinaire.

30

23. Vaccin selon l'une des revendications 8 à 10, 18 et 22, caractérisé en ce qu'il comprend des antigènes de plusieurs des circovirus tels que définis aux revendications 1 à 4.

24. Vaccin selon l'une des revendications 8 à 10, 18, 22, 23, caractérisé

en ce qu'il comprend en outre au moins une autre valence correspondant à un autre pathogène du porc.

5 **25.**Vaccin selon la revendication 24, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une autre valence choisie dans le groupe consistant en PRRS, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *E. coli*, rhinite atrophique, maladie d'Aujeszky, peste porcine classique, grippe porcine.

10 **26.**Vaccin selon la revendication 24, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une autre valence choisie dans le groupe consistant en PRRS et *Mycoplasma hyopneumoniae*.

15 **27.** Sonde ou amorce comprenant tout ou partie de la séquence selon l'une des revendications 11 à 13.

20 **28.** Anticorps polyclonaux ou monoclonaux préparés à partir du circovirus selon l'une des revendications 1 à 5, des polypeptides selon la revendication 14 ou 17 ou leurs fragments.

25 **29.** Méthode de détection du circovirus porcin, dans lequel, dans un échantillon de fluide physiologique ou un prélèvement de tissu d'un porc à tester, on recherche la présence d'un antigène en cherchant à détecter soit l'antigène lui-même soit des anticorps dirigés contre cet antigène.

30

Figure N° 1

Séquence de l'isolat PCV Imp1011-48121 (SEQ ID N°1)

1 AATTCAACCT TAACCTTCT TATTCTGTAG TATTCAAAGG GCACAGAGCG
51 GGGGTTTGAG CCCCCTCCTG GGGGAAGAAA GTCAATTATA TTGAATCTCA
101 TCATGTCCAC CGCCCCAGGAG GGCGTTCTGA CTGTGGTTCG CTTGACAGTA
151 TATCCGAAGG TGCAGGGAGAG GCGGGTGTG AAGATGCCAT TTTTCCTTCT
201 CCAGCGGTAA CGGTGGCGGG GGTGGACGAG CCAGGGGCGG CGGCAGGAGGA
251 TCTGGCCAAG ATGGCTGCGG GGGCGGTGTC TTCTTCTCCG GTAACGCCCTC
301 CTTGGATACG TCATATCTGA AAACGAAAGA AGTGCCTGT AAGTATTACC
351 AGCGCACTTC GCCAGCGGCA GCACCTCGGC AGCACCTCAG CAGCAACATG
401 CCGAGCAAGA AGAATGGAAG AAGCGGACCC CAACCCATA AAAGGTGGGT
451 GTTCACTCTG AATAATCCTT CCGAAGACGA GCGCAAGAAA ATACGGGATC
501 TTCCAATATC CCTATTGAT TATTTATTG TTGGCGAGGA GGGTAATGAG
551 GAAGGACGAA CACCTCACCT CCAGGGGTTTC GCTAATTG TGAAGAAGCA
601 GACTTTAAT AAAGTGAAGT GGTATTTGGG TGCCCGCTGC CACATCGAGA
651 AAGCGAAAGG AACAGATCAG CAGAATAAAG AATACTGCAG TAAAGAAGGC
701 AACTTACTGA TGGAGTGTGG AGCTCCTAGA TCTCAGGGAC AACGGAGTGA
751 CCTGTCTACT GCTGTGAGTA CCTTGTGGA GAGCGGGAGT CTGGTGACCG
801 TTGCAGAGCA GCACCCCTGTA ACCTTGTCA GAAATTCCG CGGGCTGGCT
851 GAACTTTGA AAGTGAGCGG GAAAATGCAG AAGCGTGATT GGAAGACTAA
901 TGTacACGTC ATTGTGGGGC CACCTGGGTG TGGTAAAAGC AAATGGGCTG
951 CTAATTTCGC AGACCCGGAA ACCACATACT GGAAACCACC TAGAAACAAG
1001 TGGTGGGATG GTTACCATGG TGAAGAAGTG GTTGTATTG ATGACTTTA
1051 TGGCTGGCTG CCCTGGGATG ATCTACTGAG ACTGTGTGAT CGATATCCAT
1101 TGACTGTAGA GACTAAAGGT GGAACGTGAC CTTTTTGCG CCGCAGTATT
1151 CTGATTACCA GCAATCAGAC CCCGTTGGAA TGGTACTCCT CAACTGCTGT
1201 CCCAGCTGTA GAAGCTCTT ATCGGAGGAT TACTTCCTG GTATTTGGA

Figure N° 1 (suite et fin)

1251 AGAATGCTAC AGAACAAATCC ACGGAGGAAG GGGGCCAGTT CGTCACCCCTT
1301 TCCCCCCCCAT GCCCTGAATT TCCATATGAA ATAAATTACT GAGTCTTTTT
1351 TATCACTTCG TAATGGTTTT TATTATTCAT TAAGGGTTAA GTGGGGGGTC
1401 TTTAAGATTA AATTCTCTGA ATTGTACATA CATGGTTACA CGGATATTGT
1451 ATTCCCTGGTC GTATATACTG TTTTCGAACG CAGTGCCGAG GCCTACGTGG
1501 TCTACATTTC CAGCAGTTG TAGTCTCAGC CACAGCTGGT TTCTTTGTT
1551 GTTTGGTTGG AAGTAATCAA TAGTGGAAATC TAGGACAGGT TTGGGGGTAA
1601 AGTAGCGGGA CTGGTAGGAG AAGGGCTGGG TTATGGTATG GCAGGAGGAG
1651 TAGTTTACAT AGGGGTACATA GGTGAGGGCT GTGGCCTTTG TTACAAAGTT
1701 ATCATCTAGA ATAACAGCAC TGGAGCCCAC TCCCCTGTCA CCCTGGGTGA
1751 TCGGGGAGCA GGGCCAG

Figure N° 2

Séquence de l'isolat PCV Imp1011-48285 (SEQ ID N°2)

1 AATTCAACCT TAACCTTTCT TATTCTGTAG TATTCAAAGG GCACAGAGCG
51 GGGGTTTGAG CCCCTCCTG GGGGAAGAAA GTCATTAATA TTGAATCTCA
101 TCATGTCCAC CGCCCAGGAG GGCGTTTGA CTGTGGTTCG CTTGACAGTA
151 TATCCGAAGG TGCGGGAGAG GCGGGTGTG AAGATGCCAT TTTTCCTTCT
201 CCAGCGGTAA CGGTGGCGGG GGTGGACGAG CCAGGGGCGG CGGCAGGAGGA
251 TCTGGCCAAG ATGGCTGCGG GGGCGGTGTC TTCTTCTCCG GTAACGCCTC
301 CTTGGATAACG TCATATCTGA AAACGAAAGA AGTGCCTGT AAGTATTACC
351 AGCGCACTTC GGCAGCGGCA GCACCTCGGC AGCACCTCAG CAGCAACATG
401 CCCAGCAAGA AGAATGGAAG AAGCGGACCC CAACCCATA AAAGGTGGGT
451 GTTCACTCTG AATAATCCTT CCGAAGACGA GCGCAAGAAA ATACGGGATC
501 TTCCAATATC CCTATTTGAT TATTTTATTG TTGGCGAGGA GGGTAATGAG
551 GAAGGACGAA CACCTCACCT CCAGGGTTC GCTAATTG TGAAGAACGA
601 GACTTTAAT AAAGTGAAGT GGTATTTGGG TGCCCGCTGC CACATCGAGA
651 AAGCGAAAGG AACAGATCAG CAGAATAAAG AATACTGCAG TAAAGAAGGC
701 AACTTACTGA TGGAGTGTGG AGCTCCTAGA TCTCAGGGAC AACGGAGTGA
751 CCTGTCTACT GCTGTGAGTA CCTTGTGGA GAGCGGGAGT CTGGTGACCG
801 TTGCAGAGCA GCACCCCTGTA ACCTTTGTCA GAAATTCCG CGGGCTGGCT
851 GAACTTTGA AAGTGAGCGG GAAAATGCAG AAGCGTGATT GGAAGACTAA
901 TGTACACGTC ATTGTGGGGC CACCTGGGTG TGGTAAAAGC AAATGGGCTG
951 CTAATTTGC AGACCCGGAA ACCACATACT GGAAACCACC TAGAAACAAG
1001 TGGTGGGATG GTTACCATGG TGAAGAAGTG GTTGTATTG ATGACTTTA
1051 TGGCTGGCTG CCCTGGGATG ATCTACTGAG ACTGTGTGAT CGATATCCAT
1101 TGACTGTAGA GACTAAAGGT GGAACGTGAC CTTTTTGCG CCGCAGTATT
1151 CTGATTACCA GCAATCAGAC CCCGTTGGAA TGGTACTCCT CAACTGCTGT
1201 CCCAGCTGTA GAAGCTCTT ATCGGAGGAT TACTTCCTG GTATTTGGA

Figure N° 2 (suite et fin)

1251 AGAATGCTAC AGAACAAATCC ACGGAGGAAG GGGGCCAGTT CGTCACCCCTT
1301 TCCCCCCCCAT GCCCTGAATT TCCATATGAA ATAAATTACT GAGTCTTTTT
1351 TATCACTTCG TAATGGTTTT TATTATTCAT TAAGGGTTAA GTGGGGGGTC
1401 TTTAAGATTA AATTCTCTGA ATTGTACATA CATGGTTACA CGGATATTGT
1451 ATTCCTGGTC GTATATACTG TTTTCGAACG CAGTGCCGAG GCCTACGTGG
1501 TCTACATTTC CAGTAGTTG TAGTCTCAGC CACAGCTGAT TTCTTTGTT
1551 GTTTGGTTGG AAGTAATCAA TAGTGGAAATC TAGGACAGGT TTGGGGGTAA
1601 AGTAGCGGGA GTGGTAGGAG AAGGGCTGGG TTATGGTATG GCGGGAgGAG
1651 TAGTTACAT AGGGGTCAATA GGTGAgGGCT GTGGCCTTTG TTACAAAGTT
1701 ATCATCTAGA ATAACAGCAC TGGAGCCCAC TCCCCTGTCA CCCTGGGTGA
1751 TCGGGGAGCA GGGCCAG

Figure N° 3

Séquence de l'isolat PCV Imp999 (SEQ ID N°3)

1 AATTCAACCT TAAACCTTTT TATTCTGTAG TATTCAAAGG GTATAGAGAT
51 TTTGTTGGTC CCCCTCCCG GGGGAACAAA GTCGTCAATA TTAAATCTCA
101 TCATGTCCAC CGCCCAGGAG GGC GTTCTGA CTGTGGTAGC CTTGACAGTA
151 TATCCGAAGG TGC GGGAGAG GC GGGTGTG AAGATGCCAT TTTCCCTCT
201 CCAACGGTAG CGGTGGCGGG GGTGGACGAG CCAGGGCGG CGGGCGGAGGA
251 TCTGGCCAAG ATGGCTGCGG GGGCGGTGTC TTCTTCTGCG GTAACGCCTC
301 CTTGGATAACG TCATAGCTGA AAACGAAAGA AGTGCCTGT AAGTATTACC
351 AGCGCACTTC GGCA GCGGCA GCACCTCGGC AGCACCTCAG CAGCAACATG
401 CCCAGCAAGA AGAATGGAAG AAGCGGACCC CAACCACATA AAAGGTGGGT
451 GTTCACGCTG AATAATCCTT CCGAAGACGA GCGCAAGAAA ATACGGGAGC
501 TCCCAATCTC CCTATTTGAT TATTTTATTG TTGGCGAGGA GGGTAATGAG
551 GAAGGACGAA CACCTCACCT CCAGGGTTC GCTAATTTG TGAAGAAGCA
601 AACTTTAAT AAAGTGAAGT GGTATTTGGG TGCCCGCTGC CACATCGAGA
651 AAGCCAAAGG AACTGATCAG CAGAATAAAG AATATTGCAG TAAAGAAGGC
701 AACTTACTTA TTGAATGTGG AGCTCCTCGA TCTCAAGGAC AACGGAGTGA
751 CCTGTCTACT GCTGTGAGTA CCTTGTTGGA GAGCGGGAGT CTGGTGACCG
801 TTGCAGAGCA GCACCCGTGA AC GTTTGTC GAAATTTCCG CGGGCTGGCT
851 GAACTTTGA AAGTGAGCGG GAAAATGCAG AAGCGTGATT GGAAGACCAA
901 TGTACACGTC ATTGTGGGGC CACCTGGGTG TGGTAAAAGC AAATGGGCTG
951 CTAATTTGC AGACCCGGAA ACCACATACT GGAAACCACC TAGAAACAAG
1001 TGGTGGGATG GTTACCATGG TGAAGAAGTG GTTGTATTG ATGACTTTA
1051 TGGCTGGCTG CCGTGGGATG ATCTACTGAG ACTGTGTGAT CGATATCCAT
1101 TGACTGTAGA GACTAAAGGT GGA ACTGTAC CTTTTTGCG CCGCAGTATT
1151 CTGATTACCA GCAATCAGAC CCCGTTGGAA TGGTACTCCT CAACTGCTGT
1201 CCCAGCTGTA GAAGCTCTCT ATCGGAGGAT TAC TTCCCTTG GTATTTGGA

Figure N° 3 (suite et fin)

1251 AGAATGCTAC AGAACAAATCC ACGGAGGAAG GGGGCCAGTT CGTCACCCTT
1301 TCCCCCCCCAT GCCCTGAATT TCCATATGAA ATAAAATTACT GAGTCTTTTT
1351 TATCACTTCG TAATGGTTTT TATTATTCAT TTAGGGTTTA AGTGGGGGGT
1401 CTTTAAGATT AAATTCTCTG AATTGTACAT ACATGGTTAC ACGGATATTG
1451 TAGTCCTGGT CGTATATACT GTTTTCGAAC GCAGTGCCGA GGCTACGTG
1501 GTCCACATTT CTAGAGGTTT GTAGCCTCAG CCAAAGCTGA TTCCTTTGT
1551 TATTTGGTTG GAAGTAATCA ATAGTGGAGT CAAGAACAGG TTTGGGTGTG
1601 AAGTAACGGG AGTGGTAGGA GAAGGGTTGG GGGATTGTAT GGCGGGAGGA
1651 GTAGTTACA TATGGGTCA AGGTTAGGGC TGTGGCCTTT GTTACAAAGT
1701 TATCATCTAG AATAACAGCA GTGGAGCCCA CTCCCCTATC ACCCTGGGTG
1751 ATGGGGGAGC AGGGCCAG

Figure N° 4

Séquence de l'isolat PCV Imp1010 (SEQ ID N°4)

1 AATTCAACCT TAACCTTCT TATTCTGTAG TATTCAAAGG GTATAGAGAT
51 TTTGTTGGTC CCCCTCCCG GGGAAACAAA GTCGTCAATT TTAAATCTCA
101 TCATGTCCAC CGCCCAGGAG GGCGTTGTGA CTGTGGTACG CTTGACAGTA
151 TATCCGAAGG TGCGGGAGAG GCGGGTGTTG AAGATGCCAT TTTTCCTTCT
201 CCAACGGTAG CGGTGGCGGG GGTGGACGAG CCAGGGCGG CGGCGGAGGA
251 TCTGGCCAAG ATGGCTGCGG GGGCGGTGTC TTCTTCTGCG GTAACGCCTC
301 CTTGGATAACG TCATAGCTGA AAACGAAAGA AGTGCCTGT AAGTATTACC
351 AGCGCACTTC GGCAAGCGGA GCACCTCGGC AGCACCTCAG CAGCAACATG
401 CCCAGCAAGA AGAATGGAAG AAGCGGACCC CAACCACATA AAAGGTGGGT
451 GTTCACGCTG AATAATCCTT CCGAAGACGA GCGCAAGAAA ATACGGGAGC
501 TCCAATCTC CCTATTTGAT TATTTTATTG TTGGCGAGGA GGGTAATGAG
551 GAAGGACGAA CACCTCACCT CCAGGGGTTTC GCTAATTTG TGAAGAACGA
601 AACTTTAAT AAAGTGAAGT GGTATTTGGG TGCCCGCTGC CACATCGAGA
651 AAGCCAAAGG AACTGATCAG CAGAATAAAG AATATTGCAG TAAAGAAGGC
701 AACTTACTTA TTGAATGTGG AGCTCCTCGA TCTCAAGGAC AACGGAGTGA
751 CCTGTCTACT GCTGTGAGTA CCTTGTTGGA GAGCGGGAGT CTGGTGACCG
801 TTGCAGAGCA GCACCCCTGTA ACCTGGGTCA GAAATTTCCG CGGGCTGGCT
851 GAACTTTGA AAGTGAGCGG GAAAATGCAG AAGCGTGATT GGAAGACCAA
901 TGTACACGTC ATTGTGGGGC CACCTGGGTG TGGTAAAAGC AAATGGGCTG
951 CTAATTTGC AGACCCGGAA ACCACATACT GGAAACCACC TAGAAACAAG
1001 TGGTGGGATG GTTACCATGG TGAAGAAGTG GTTGTATTG ATGACTTTA
1051 TGGCTGGCTG CCGTGGGATG ATCTACTGAG ACTGTGTGAT CGATATCCAT
1101 TGACTGTAGA GACTAAAGGT GGAACGTAC CTTTTTGCG CCGCAGTATT
1151 CTGATTACCA GCAATCAGAC CCCGTTGGAA TGGTACTCCT CAACTGCTGT
1201 CCCAGCTGTA GAAGCTCTCT ATCGGAGGAT TACTTCCTTG GTATTTGGA

Figure N° 4 (suite et fin)

1251 AGAATGCTAC AGAACAAATCC ACGGAGGAAG GGGGCCAGTT CGTCACCCTT
1301 TCCCCCCCAT GCCCTGAATT TCCATATGAA ATAAATTACT GAGTCTTTTT
1351 TATCACTTCG TAATGGTTTT TATTATTCAT TTAGGGTTA AGTGGGGGGT
1401 CTTTAAGATT AAATTCTCTG AATTGTACAT ACATGGTTAC ACGGATATTG
1451 TAGTCCTGGT CGTATTTACT GTTTTCAAC GCAGCGCCGA GGCCTACGTG
1501 GTCCACATTT CCAGAGGTTT GTAGTCTCAG CCAAAGCTGA TTCCTTTGT
1551 TATTTGGTTG GAAGTAATCA ATAGTGGAGT CAAGAACAGG TTTGGGTGTG
1601 AAGTAACGGG AGTGGTAGGA GAAGGGTTGG GGGATTGTAT GGCGGGAGGA
1651 GTAGTTACA TATGGGTCA AGGTTAGGGC TGTGGCCTTT GTTACAAAGT
1701 TATCATCTAG AATAACAGCA GTGGAGCCCA CTCCCCTATC ACCCTGGGTG
1751 ATGGGGGAGC AGGGCCAG

Figure N° 5

Alignement multiple de séquences CLUSTAL W

Figure N° 5 (suite)

PCVPK-15	-----AAGCGGCCGCAACCCATAAGAGGTGGGTGTTCACCTTAATAATCCTTC
IMP999-ECO	GAATGGAAGAACGGGACCCAACCACATAAAAGGTGGGTGTTCACGCTGAATAATCCTTC
IMP1010-ST	GAATGGAAGAACGGGACCCAACCACATAAAAGGTGGGTGTTCACGCTGAATAATCCTTC
IMP1011-48	GAATGGAAGAACGGGACCCAACCACATAAAAGGTGGGTGTTCACTCTGAATAATCCTTC
IMP1011-48	GAATGGAAGAACGGGACCCAACCACATAAAAGGTGGGTGTTCACTCTGAATAATCCTTC

PCVPK-15	CGAGGAGGAGAAAAACAAAATACGGGAGCTTCAATCTCCCTTTGATTATTTGTTG
IMP999-ECO	CGAAGACGAGCGCAAGAAAATACGGGAGCTCCAATCTCCCTATTGATTATTTATTGT
IMP1010-ST	CGAAGACGAGCGCAAGAAAATACGGGAGCTCCAATCTCCCTATTGATTATTTATTGT
IMP1011-48	CGAAGACGAGCGCAAGAAAATACGGGATCTTCAATATCCCTATTGATTATTTATTGT
IMP1011-48	CGAAGACGAGCGCAAGAAAATACGGGATCTTCAATATCCCTATTGATTATTTATTGT

PCVPK-15	CGGAGAGGAAGGTTGGAAGAGGGTAGAACTCCTCACCTCCAGGGGTTGCGAATTTGC
IMP999-ECO	TGGCGAGGAGGGTAATGAGGAAGGACGAACACCTCACCTCCAGGGGTTGCGTAATTTGT
IMP1010-ST	TGGCGAGGAGGGTAATGAGGAAGGACGAACACCTCACCTCCAGGGGTTGCGTAATTTGT
IMP1011-48	TGGCGAGGAGGGTAATGAGGAAGGACGAACACCTCACCTCCAGGGGTTGCGTAATTTGT
IMP1011-48	TGGCGAGGAGGGTAATGAGGAAGGACGAACACCTCACCTCCAGGGGTTGCGTAATTTGT

PCVPK-15	TAAGAACGAGACTTTAACAAAGGTGAAGTGGTATTTGGTCCCCGTGCCACATCGAGAA
IMP999-ECO	GAAGAACGAAACTTTAACAAAGGTGAAGTGGTATTTGGTCCCCGTGCCACATCGAGAA
IMP1010-ST	GAAGAACGAAACTTTAACAAAGGTGAAGTGGTATTTGGTCCCCGTGCCACATCGAGAA
IMP1011-48	GAAGAACGAGACTTTAACAAAGGTGAAGTGGTATTTGGTCCCCGTGCCACATCGAGAA
IMP1011-48	GAAGAACGAGACTTTAACAAAGGTGAAGTGGTATTTGGTCCCCGTGCCACATCGAGAA

PCVPK-15	AGCGAAAGGAACCGACCAGCAGAATAAAGAATACTGCAGTAAAGAAGGCCACATACTTAT
IMP999-ECO	AGCCAAAGGAACTGATCAGCAGAATAAAGAATACTGCAGTAAAGAAGGCCACATACTTAT
IMP1010-ST	AGCCAAAGGAACTGATCAGCAGAATAAAGAATACTGCAGTAAAGAAGGCCACATACTTAT
IMP1011-48	AGCGAAAGGAACAGATCAGCAGAATAAAGAATACTGCAGTAAAGAAGGCCACATACTTAT
IMP1011-48	AGCGAAAGGAACAGATCAGCAGAATAAAGAATACTGCAGTAAAGAAGGCCACATACTTAT

PCVPK-15	CGAGTGTGGAGCTCCGGGAACCAGGGGAAGCGCAGCGACCTGTCTACTGCTGTGAGTAC
IMP999-ECO	TGAATGTGGAGCTCTCGATCTCAAGGACAACGGAGTGACCTGTCTACTGCTGTGAGTAC
IMP1010-ST	TGAATGTGGAGCTCTCGATCTCAAGGACAACGGAGTGACCTGTCTACTGCTGTGAGTAC
IMP1011-48	GGAGTGTGGAGCTCTAGATCTCAGGGACAACGGAGTGACCTGTCTACTGCTGTGAGTAC
IMP1011-48	GGAGTGTGGAGCTCTAGATCTCAGGGACAACGGAGTGACCTGTCTACTGCTGTGAGTAC

PCVPK-15	CCTTTGGAGACGGGTCTTGGTACTGTAGCCGAGCAGTCCCTGTAACGTATGTGAG
IMP999-ECO	CTTGGTGGAGAGCGGGAGTCTGGTGACCGTTGCAGAGCAGCACCCCTGTAACGTTGTCAG
IMP1010-ST	CTTGGTGGAGAGCGGGAGTCTGGTGACCGTTGCAGAGCAGCACCCCTGTAACGTTGTCAG
IMP1011-48	CTTGGTGGAGAGCGGGAGTCTGGTGACCGTTGCAGAGCAGCACCCCTGTAACGTTGTCAG
IMP1011-48	CTTGGTGGAGAGCGGGAGTCTGGTGACCGTTGCAGAGCAGCACCCCTGTAACGTTGTCAG

PCVPK-15	AAATTTCGGGGCTGGCTGAACCTTTGAAAGTGAGCGGGAAAGATGCAGCAGCGTGATTG
IMP999-ECO	AAATTTCGGGGCTGGCTGAACCTTTGAAAGTGAGCGGGAAAGATGCAGCAGCGTGATTG
IMP1010-ST	AAATTTCGGGGCTGGCTGAACCTTTGAAAGTGAGCGGGAAAGATGCAGCAGCGTGATTG
IMP1011-48	AAATTTCGGGGCTGGCTGAACCTTTGAAAGTGAGCGGGAAAGATGCAGCAGCGTGATTG
IMP1011-48	AAATTTCGGGGCTGGCTGAACCTTTGAAAGTGAGCGGGAAAGATGCAGCAGCGTGATTG

Figure N° 5 (suite)

PCVPK-15	GAAGACAGCTGTACACGTACAGTCATAGTGGGCCCGCCGGTGTGGAAAGAGCCAGTGGCCCG
IMP999-ECO	GAAGACCAATGTACACGTACAGTCATTGTGGGCCACCTGGGTGTGGTAAAAGCAAATGGGCTGC
IMP1010-ST	GAAGACCAATGTACACGTACAGTCATTGTGGGCCACCTGGGTGTGGTAAAAGCAAATGGGCTGC
IMP1011-48	GAAGACTAATGTACACGTACAGTCATTGTGGGCCACCTGGGTGTGGTAAAAGCAAATGGGCTGC
IMP1011-48	GAAGACTAATGTACACGTACAGTCATTGTGGGCCACCTGGGTGTGGTAAAAGCAAATGGGCTGC

PCVPK-15	TAATTTGCTGAGCCTAGGGACACCTACTGGAAGCCTAGTAGAAATAAGTGGTGGGATGG
IMP999-ECO	TAATTTGAGACCCGAAACCACATACACTGGAACACCACCTAGAAACAAGTGGTGGGATGG
IMP1010-ST	TAATTTGAGACCCGAAACCACATACACTGGAACACCACCTAGAAACAAGTGGTGGGATGG
IMP1011-48	TAATTTGAGACCCGAAACCACATACACTGGAACACCACCTAGAAACAAGTGGTGGGATGG
IMP1011-48	TAATTTGAGACCCGAAACCACATACACTGGAACACCACCTAGAAACAAGTGGTGGGATGG

PCVPK-15	ATATCATGGAGAAGAAGTTGTTGTTGGATGATTTATGGCTGGTACCTTGGGATGA
IMP999-ECO	TTACCATGGTGAAGAAGTGGTTGTTATTGATGACTTTATGGCTGGCTGCCGTGGGATGA
IMP1010-ST	TTACCATGGTGAAGAAGTGGTTGTTATTGATGACTTTATGGCTGGCTGCCGTGGGATGA
IMP1011-48	TTACCATGGTGAAGAAGTGGTTGTTATTGATGACTTTATGGCTGGCTGCCGTGGGATGA
IMP1011-48	TTACCATGGTGAAGAAGTGGTTGTTATTGATGACTTTATGGCTGGCTGCCGTGGGATGA

PCVPK-15	TCTACTGAGACTGTGTGACCGGTATCCATTGACTGTAGAGACTAAAGGGGGTACTGTTCC
IMP999-ECO	TCTACTGAGACTGTGTGATCGATATCCATTGACTGTAGAGACTAAAGGTGGAACTGTACC
IMP1010-ST	TCTACTGAGACTGTGTGATCGATATCCATTGACTGTAGAGACTAAAGGTGGAACTGTACC
IMP1011-48	TCTACTGAGACTGTGTGATCGATATCCATTGACTGTAGAGACTAAAGGTGGAACTGTACC
IMP1011-48	TCTACTGAGACTGTGTGATCGATATCCATTGACTGTAGAGACTAAAGGTGGAACTGTACC

PCVPK-15	TTTTTGCCCCGCAGTATTGATTACCAAGCAATCAGGCCCGAGGAATGGTACTCCTC
IMP999-ECO	TTTTTGCCCCGCAGTATTGATTACCAAGCAATCAGACCCGTTGGAATGGTACTCCTC
IMP1010-ST	TTTTTGCCCCGCAGTATTGATTACCAAGCAATCAGACCCGTTGGAATGGTACTCCTC
IMP1011-48	TTTTTGCCCCGCAGTATTGATTACCAAGCAATCAGACCCGTTGGAATGGTACTCCTC
IMP1011-48	TTTTTGCCCCGCAGTATTGATTACCAAGCAATCAGACCCGTTGGAATGGTACTCCTC

PCVPK-15	AACTGCTGTCCCAGCTGTAGAACGCTCTATCGGAGGATTACTACTTTGCAATTGGAA
IMP999-ECO	AACTGCTGTCCCAGCTGTAGAACGCTCTATCGGAGGATTACTCCTTGGTATTGGAA
IMP1010-ST	AACTGCTGTCCCAGCTGTAGAACGCTCTATCGGAGGATTACTCCTTGGTATTGGAA
IMP1011-48	AACTGCTGTCCCAGCTGTAGAACGCTCTTATCGGAGGATTACTCCTTGGTATTGGAA
IMP1011-48	AACTGCTGTCCCAGCTGTAGAACGCTCTTATCGGAGGATTACTCCTTGGTATTGGAA

PCVPK-15	GAATGCTGGAGAACAAATCCACGGAGGTACCGAAGGCCGATTGAAGCAGTGGACCCACC
IMP999-ECO	GAATGCTACAGAACAAATCCACGGAGGAA---GGGGGCCAGTCGTCACCCCTTCCCCCCC
IMP1010-ST	GAATGCTACAGAACAAATCCACGGAGGAA---GGGGGCCAGTCGTCACCCCTTCCCCCCC
IMP1011-48	GAATGCTACAGAACAAATCCACGGAGGAA---GGGGGCCAGTCGTCACCCCTTCCCCCCC
IMP1011-48	GAATGCTACAGAACAAATCCACGGAGGAA---GGGGGCCAGTCGTCACCCCTTCCCCCCC

PCVPK-15	CTGTGCCCTTCCATATAAAATAATTACTGAGTCCTTGTATCACATCGTAATG
IMP999-ECO	ATGCCCTGAATTCCATATGAAATAAAATTACTGAGTCCTT---TATCACTTCGTAATG
IMP1010-ST	ATGCCCTGAATTCCATATGAAATAAAATTACTGAGTCCTT---TATCACTTCGTAATG
IMP1011-48	ATGCCCTGAATTCCATATGAAATAAAATTACTGAGTCCTT---TATCACTTCGTAATG
IMP1011-48	ATGCCCTGAATTCCATATGAAATAAAATTACTGAGTCCTT---TATCACTTCGTAATG

Figure N° 5 (suite et fin)

PCVPK-15	GTTTTTATT-TTTATTTA---TTA---GAGGGTCTTTAGGATAAAATTCTCTGAATTG
IMP999-ECO	GTTTTTATTATTCAATTAGGGTTAACGTGGGGGTCTTAAGATTAATTCTCTGAATTG
IMP1010-ST	GTTTTTATTATTCAATTAGGGTTAACGTGGGGGTCTTAAGATTAATTCTCTGAATTG
IMP1011-48	GTTTTTATTATTCAATTAGGGTTAACGTGGGGGTCTTAAGATTAATTCTCTGAATTG
IMP1011-48	GTTTTTATTATTCAATTAGGGTTAACGTGGGGGTCTTAAGATTAATTCTCTGAATTG ***** *****
PCVPK-15	TACATAAATAGTCAGCCTTACACACATAATTGGGCTGTGGCTGC-ATTTGGAGCGCAT
IMP999-ECO	TACATACATGGTTACACGGATATTGTAGTCCTGG-TCGTATATACTGTTTCGAACGCAG
IMP1010-ST	TACATACATGGTTACACGGATATTGTAGTCCTGG-TCGTATTTACTGTTTCGAACGCAG
IMP1011-48	TACATACATGGTTACACGGATATTGTAGTCCTGG-TCGTATATACTGTTTCGAACGCAG
IMP1011-48	TACATACATGGTTACACGGATATTGTAGTCCTGG-TCGTATATACTGTTTCGAACGCAG ***** *****
PCVPK-15	AGCCGAGGCCTGTGTGCTCGACATTGGTGGGTATTAAATGGAGCCACAGCTGGTTTC
IMP999-ECO	TGCCGAGGCCTACGTGGTCCACATTCTAGAGGTTGTAGCCTCAGCCAAAGCTGATTCC
IMP1010-ST	CGCCGAGGCCTACGTGGTCCACATTCCAGAGGTTGTAGTCTCAGCCAAAGCTGATTCC
IMP1011-48	TGCCGAGGCCTACGTGGTCTACATTCCAGCAGTTGTAGTCTCAGCCACAGCTGGTTTC
IMP1011-48	TGCCGAGGCCTACGTGGTCTACATTCCAGTAGTTGTAGTCTCAGCCACAGCTGATTTC ***** *****
PCVPK-15	TTTTATTATTGGTGGAACCAATCAATTGGTGGTCCAGCTCAGGTTGGGGTGAAGT
IMP999-ECO	TTTGTTATTGGTGGAAAGTAATCAATAGTGGAGTCAGAACAGGTTGGGTGTGAAGT
IMP1010-ST	TTTGTTATTGGTGGAAAGTAATCAATAGTGGAGTCAGAACAGGTTGGGTGTGAAGT
IMP1011-48	TTTGTTGGTTGGTGGAAAGTAATCAATAGTGGAACTAGGACAGGTTGGGGTAAAGT
IMP1011-48	TTTGTTGGTTGGTGGAAAGTAATCAATAGTGGAACTAGGACAGGTTGGGGTAAAGT ***** *****
PCVPK-15	ACCTGGAGTGGTAGGTAAAGGGCTGCCTTATGGTGGCGGGAGGAGTAGTTAATATAGG
IMP999-ECO	AACGGGAGTGGTAGGAGAACGGTTGGGGATTGTATGGCGGGAGGAGTAGTTACATATG
IMP1010-ST	AACGGGAGTGGTAGGAGAACGGTTGGGGATTGTATGGCGGGAGGAGTAGTTACATATG
IMP1011-48	AGCGGGAGTGGTAGGAGAACGGCTGGTTATGGTATGGCGGGAGGAGTAGTTACATAGG
IMP1011-48	AGCGGGAGTGGTAGGAGAACGGCTGGTTATGGTATGGCGGGAGGAGTAGTTACATAGG ***** *****
PCVPK-15	GGTCATAGGCCAAGTTGGAGGGGGTACAAAGTTGGCATCCAAGATAACAACAGTGG
IMP999-ECO	GGTCATAGGTTAGGGCTGTGGCCTTGTACAAAGTTATCATCTAGAATAACAGCAGTGG
IMP1010-ST	GGTCATAGGTTAGGGCTGTGGCCTTGTACAAAGTTATCATCTAGAATAACAGCAGTGG
IMP1011-48	GGTCATAGGTTAGGGCTGTGGCCTTGTACAAAGTTATCATCTAGAATAACAGCACTGG
IMP1011-48	GGTCATAGGTTAGGGCTGTGGCCTTGTACAAAGTTATCATCTAGAATAACAGCACTGG ***** *****
PCVPK-15	ACCCAACACCTTTGATTAGAGGTGATGGGGTCTCTGGGTAA
IMP999-ECO	AGCCCACCTCCCTATCACCCCTGGGTGATGGGGAGCAGGGCCAG
IMP1010-ST	AGCCCACCTCCCTATCACCCCTGGGTGATGGGGAGCAGGGCCAG
IMP1011-48	AGCCCACCTCCCTGTACCCCTGGGTGATGGGGAGCAGGGCCAG
IMP1011-48	AGCCCACCTCCCTGTACCCCTGGGTGATGGGGAGCAGGGCCAG ***** *****

Figure N°6

1 GAATTCAACC TTAACCTTTT TTATTCTGTA gTATTCAAAG GGTATAaAga
51 TTTTGTTGGT CCCCCCTCCC GGGGAAACAA AGTCgTCAAT ATTAAATCTC
101 ATCATGTCCA CCGCCCAGGA GGGCGTTCTG ACTGTGGTAG CCTTGACAgT
151 ATATCCGAAG GTGCAGGGAGA rGCAGGGTGT GAAAATGCCA TTTTCCTTC
201 TCCAACGGTA GCGGTGGCGG GGGTGGACmA nCCAcgGGCG GCAGCAGGAWG
251 ATCTGGCCAA GATGGCTGCG GGGGCGGTGT CTTCCTCTGC GGTAACGCCT
301 CCTTGGATAC GTCATAGCTG AAAACGAAAG AAGTGCCTG TAaGTATTAC
351 CAGCGCACTT CGGCAGCGGC AGCACCTCGG CAGCaCCTCA GCAGCAACAT
401 GCCCAGCAAG AAGAATGGAA GAAGCGGACC CCAACCACAT AAAAGGTGGG
451 TGTTCACGCT GAATAATCCT TCCGAAGACG AGCGCAAGAA AATACGGGAG
501 CTCCCaATCT CCCTATTTGA TTATTTTATT GTTGGCGAGG AGGGTwwTGA
551 gGAAnGACgA ACACCTCACC TCCAGGGTT CGCTAATTTT GTGAAGAAgC
601 aaACTTtTAA TAAAGTGAAG TGGTATTGG GTGCCCGCTG CCACATCGAG
651 AAAGCCaaAG GAACTGATCA GCAGAATAAA GAATATTGCA GTAAAGAAGG
701 CAACTTACTT ATTGAATGTG GAGCTCCTCG ATCTCAAGGA CAACGGAGTG
751 ACCTGTCTAC TGCTGTGAGT ACCTTGTGG AGAGCGGGAG TCTGGTGACC
801 GTTGCAGAGC AGCACCCGT AACGTTGTC AGAAATTCC GCGGGCTGGC
851 TGAACCTTG AAAGTGAGCG GGAAAATGCA GAAGCGTGAT TGGAAGACCA
901 ATGTACACGT CATTGTGGGG CCACCTGGGT GTGGTAAAAG CAAATGGGCT
951 GCTAATTTG CAGACCCGGA AACCAACATAC TGGAAACCAC CTAGAAACAA
1001 GTGGTGGGAT GGTTACCATG GTGAAGAAGT GGTTGTTATT GATGACTTTT
1051 ATGGCTGGCT GCCGTGGGAT GATCTACTGA GACTGTGTGA TCGATATCCA
1101 TTGACTGTAG AGACTAAAGG TGGAACGTGA CNNNNNNNNGG CCCGCAGTAT
1151 TCTGATTACC AGCAATCAGA CCCC GTtGGA ATGGTACTCC TCAACTGCTG
1201 TCCCAGCTGT AGAAGCTCTC TATCGGAGGA ttACTTCCTT GGTATTTtGG
1251 AaGAATGCTA CAGAACAAATC CACGGAGGAA GGGGGCCAGT TnGTCACCCT

Figure N°6 (suite)

1301 TTCCCCCCCA TGCCcTGAAT TTCCATaTGA AATAAATTAC TGAGTCTTTT
1351 TTATCACTTC GTAATGGTTT TTATTATTCA TTTAGGGTTT AAGTGGGGGG
1401 TCTTTAAGAT TAAATTCTCT GAATTGTACA TACATGGTTA CACGGATAATT
1451 GTAGTCCTGG TCGTATATAC TGTTTCGAA CGCAGTGCCG AGGCCTACGT
1501 GGTCCACATT TCTAGAGGTT tGTAGCCTCA gCCAAAGctG ATTCCCTTTG
1551 TTATTTGGTT GGAAGTAATC AATAGTGGAG TCAAGAACAG GTTGGGTGT
1601 GAAGTAACGG GAGTGGTAGG AGAAGGGTTG GGGGATTGTA TGGCGGGAGG
1651 AGTAGTTTAC ATATGGGTCA TAGGTTAGGG CTGTGGCCTT TGTTACAAAG
1701 TTATCATcTA GAATAACAGC AGTGGAGCCC ACTCCCCTAT CACCCTGGGT
1751 GATGGGGGAG CAGGGCCA

Figure N°7

8con.s = séquence clone pGEM-7/8
pcvgeo = séquence souche PCV PK/15

SCORES Initl: 2517 Initn: 3774 Opt: 4010
75.8% identity in 1785 bp overlap

	1649	1639	1629	1619	1609	1599	
8con.s	TACTCCTCCCGCCATACAATCCCCCAACCCTTCTCCTACCACTCCCGTTACTTCACACCC						
pcveco	TACTCCTCCCGCCACACCATAAGGCAGCCCTTACCTACCACTCCAGGTACTTCACCCCC	130	140	150	160	170	180

1589	1579	1569	1559	1549	1539		
8con.s	AAACCTGTTCTTGACTCCACTATTGATTACTTCCAACCAAATAACAAAAGGAATCAGCTT						
pcveco	AAACCTGAGCTGGACCAAAACAATTGATTGGTTCCACCCAAATAATAAAAAGAAACCAGCTG						
	190	200	210	220	230	240	

1469 1459 1449 1439 1429 1419
 8con.s AACAGTATATAAC-GACCAGGACTACAATATCCGTGTAACCATGTATGTACAATT CAGAGA
 ||| ||| ||||| | ||| | | | ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
 pcvec0 AA-TGCAGGCCACAGCCCCAAAATTATGTGGTAAGGGCTGACTATTTATGTACAATT CAGAGA
 310 320 330 340 350

1349	1339	1329	1319	1309	1299
8con.s GAT---AAAAAAAGACTCAGTAATTATTTATGGAAATTCA	GGGCATGGGGGGGAAAG				
pcveco GATAACAAAAAAAGACTCAGTAATTATTTATGGGAAAAGGGCACAGGGTGGGTCCAC					
420	430	440	450	460	470

Figure N°7 (suite)

Figure N°7. (suite)

759	749	739	729	719	709
8con.s AGTAGACAGGTCACTCCGTTGTCCTTGAGATCGAGGAGCTCCACATTCAATAAGTAAGTT					
pcveco AGTAGACAGGTCACTCCGTTGTCCTTGAGATCGAGGAGCTCCACACTCGATAAGTATGTG					
1020	1030	1040	1050	1060	1070
699	689	679	669	659	649
8con.s GCCTTCTTACTGCAATATTCTTATTCTGCTGATCAGTTCCCTGGCTTCTCGATGTG					
pcveco GCCTTCTTACTGCACTTATTCTGCTGGTCGGTCCCTTGCTTCTCGATGTG					
1080	1090	1100	1110	1120	1130
639	629	619	609	599	589
8con.s GCAGCGGGCACCAAATACCACTCACTTATTAAAAGTTGCTTCTCACAAAATTAGC					
pcveco GCAGCGGGCACCAAATACCACTCACCTGTTAAAAGTCTGCTTCTAGCAAAATTAGC					
1140	1150	1160	1170	1180	1190
579	569	559	549	539	529
8con.s GAACCCCTGGAGGTGAGGTGTTCTGCNTTCCCTCAWWACCCTCCTGCCAACAAATAAAATA					
: : : : : :					
pcveco AAACCCCTGGAGGTGAGGTGAGGTGTTCTACCCCTCTCCAAACCTCCTCTCCGCAAAACAAATAAATA					
1200	1210	1220	1230	1240	1250
519	509	499	489	479	469
8con.s ATCAAATAGGGAGATTGGGAGCTCCGTATTTCTTGCCTCGTCTCGGAAGGATTATT					
: : : : :					
pcveco ATCAAAAAGGGAGATTGGAAGCTCCGTATTTGTTCTCCTCGGAAGGATTATT					
1260	1270	1280	1290	1300	1310
459	449	439	429	419	409
8con.s CAGCGTGAACACCCACCTTTATGTGGTTGGGTCCGCTTCTCCATTCTTCTGCTGGG					
pcveco AAGGGTGAACACCCACCTCTTATGGGGTCTGGGGCGCT-----TTCTGCTGG					
1320	1330	1340	1350	1360	
399	389	379	369	359	349
8con.s CATGTTGCTGCTGAGGTGCTGCCGAGGTGCTGCCGTGCCGAAGTGCCTGGTAATACT-					
pcveco CATTAACTGAACTTCTTCACTTTATAGGATGACGTGGCAAGGAGGCGTTACCGCAGAA					
1370	1380	1390	1400	1410	
339	329	319	309	299	289
8con.s -TACAGCGCACTTCTTTC-GTTTCAGCTATGACGTATCCAAGGAGGCGTTACCGCAGAA					
pcveco CAGCAGCGCACTTCTTCACTTTATAGGATGACGTGGCAAGGAGGCGTTACCGCAGAA					
1420	1430	1440	1450	1460	1470
279	269	259	249	239	229
8con.s GAAGACACCGCCCCCGCAGCCATCTGGCCAGATCWTCCGCCGCCGCGNTKGTC					
:					
pcveco GAAGGACCCGCCCCCGCAGCCATCTGGAAACATCCTCCGGAGAAGACCATATTGGCAC					
1480	1490	1500	1510	1520	1530

Figure N°7 (suite et fin)